



(11) **EP 2 081 954 B1**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT**

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des Hinweises auf die Patenterteilung:
13.06.2012 Patentblatt 2012/24

(21) Anmeldenummer: **07821799.9**

(22) Anmeldetag: **24.10.2007**

(51) Int Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)

(86) Internationale Anmeldenummer:
PCT/EP2007/061436

(87) Internationale Veröffentlichungsnummer:
WO 2008/049865 (02.05.2008 Gazette 2008/18)

(54) **VERFAHREN ZUR ERHÖHUNG DER RESISTENZ GEGEN BIOTROPHE PILZE IN PFLANZEN**
METHODS FOR INCREASING THE RESISTANCE OF PLANTS TO FUNGI
PROCEDE D'AUGMENTATION DE LA RESISTANCE AUX CHAMPIGNONS DANS LES PLANTES

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL PL PT RO SE SI SK TR

(30) Priorität: **24.10.2006 EP 06122870**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
29.07.2009 Patentblatt 2009/31

(73) Patentinhaber: **BASF Plant Science GmbH 67056 Ludwigshafen (DE)**

(72) Erfinder:
• **SCHULTHEISS, Holger 67435 Neustadt (DE)**
• **FRANK, Markus 67434 Neustadt (DE)**
• **HÖFLE, Caroline 85395 Wolfersdorf (DE)**

(74) Vertreter: **Popp, Andreas BASF SE Global Intellectual Property GVX - C6 67056 Ludwigshafen (DE)**

(56) Entgegenhaltungen:
WO-A-02/101079 WO-A-2004/081217
WO-A-2007/080143

- **IMANI JAFARGHOLI ET AL: "Expression of barley BAX Inhibitor-1 in carrots confers resistance to Botrytis cinerea" MOLECULAR PLANT PATHOLOGY, Bd. 7, Nr. 4, Juli 2006 (2006-07), Seiten 279-284, XP002475154 ISSN: 1464-6722**

- **EICHMANN R ET AL: "THE BARLEY APOPTOSIS SUPPRESSOR HOMOLOGUE BAX INHIBITOR-1 COMPROMISES NONHOST PENETRATION RESISTANCE OF BARLEY TO THE INAPPROPRIATE PATHOGEN BLUMERIA GRAMINIS F. SP. TRITICI" MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS, APS PRESS, ST. PAUL, MN, US, Bd. 17, Nr. 5, Mai 2004 (2004-05), Seiten 484-490, XP009033393 ISSN: 0894-0282**
- **HUECKELHOVEN R ET AL: "Overexpression of barley BAX inhibitor 1 induces breakdown of mlo-mediated penetration resistance to Blumeria graminis" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, Bd. 100, Nr. 9, 29. April 2003 (2003-04-29), Seiten 5555-5560, XP002286823 ISSN: 0027-8424**
- **HUECKELHOVEN RALPH ET AL: "Differential expression of putative cell death regulator genes in near-isogenic, resistant and susceptible barley lines during interaction with the powdery mildew fungus" PLANT MOLECULAR BIOLOGY, Bd. 47, Nr. 6, Dezember 2001 (2001-12), Seiten 739-748, XP002475155 ISSN: 0167-4412**
- **SANCHEZ P ET AL: "AtBI-1, a plant homologue of bax inhibitor-1 suppresses bax-induced, cell death in yeast and is rapidly upregulated during wounding and pathogen challenge" PLANT PUBLICATIONS, OXFORD, GB, Bd. 21, Nr. 4, 2000, Seiten 393-399, XP002968581 ISSN: 0960-7412**

EP 2 081 954 B1

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents im Europäischen Patentblatt kann jedermann nach Maßgabe der Ausführungsordnung beim Europäischen Patentamt gegen dieses Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist. (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

- ADENDORFF ET AL: "Scanning electron microscopy of direct host leaf penetration by urediospore-derived infection structures of *Phakopsora apoda*" MYCOLOGICAL RESEARCH, ELSEVIER,, GB, Bd. 104, Nr. 3, März 2000 (2000-03), Seiten 317-324, XP022454098 ISSN: 0953-7562
- CHAE H-J ET AL: "Evolutionarily conserved cytoprotection provided by Bax Inhibitor-1 homologs from animals, plants, and yeast" GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Bd. 323, 24. Dezember 2003 (2003-12-24), Seiten 101-113, XP004477034 ISSN: 0378-1119

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung von Resistenz gegen mindestens ein biotrophes Pathogen aus dem Genus *Phakopsora* in einer Sojapflanze oder einem Teil einer Sojapflanze durch Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion mindestens eines Bax Inhibitor-1 (BI-1) Proteins in mindestens einem Teil der Sojapflanze.

[0002] Der Anbau landwirtschaftlicher Kulturpflanzen dient in erster Linie der Nahrungsmittelproduktion für den Menschen und der Produktion von Futtermitteln für Tiere. In den letzten 25 Jahren sind im Pflanzenbau deutliche Steigerungen der Erträge erreicht worden. Dies gelang durch ein gutes Zusammenspiel von veränderter Anbautechnik, neuen Züchtungen, Düngung und nicht zuletzt verbessertem Pflanzenschutz. Angesichts einer ständig wachsenden Weltbevölkerung gewinnt die Nahrungssicherung zunehmend an Bedeutung. Es wird geschätzt, dass im Jahr 2010 7 Mrd. Menschen auf der Erde leben werden. Um diese zu ernähren, ohne dass der Anteil unterernährter Menschen zunimmt, müsste die Nahrungsmittelproduktion um 60 % gesteigert werden (Entrup N.L. et al., Lehrbuch des Pflanzenbaues, Thomas Mann Verlag, Gelsenkirchen, 2000). Hierfür ist effektiver Pflanzenschutz ein entscheidender Faktor. Besonders in den heute üblichen Monokulturen kommt es leicht zu einer epidemieartigen Ausbreitung von Krankheiten. Die Folge sind deutlich reduzierte Erträge. Bisher wurden die pathogenen Organismen vor allem durch den Einsatz von Pestiziden bekämpft. Heute dagegen steht dem Menschen die Möglichkeit offen die genetische Disposition einer Pflanze gegenüber einem Pathogen direkt zu verändern.

[0003] Pilze sind weltweit verbreitet und bilden eine heterogene Gruppe mit großer Artenvielfalt. Sie sind Eukaryonten, besitzen kein Chlorophyll und sind daher heterotroph. Damit sind sie auf externe Kohlenstoffquellen angewiesen, die sie sich als Parasiten, Saprophyten oder Symbionten erschließen. Saprophyten leben ausschließlich auf abgestorbenem Pflanzenmaterial. Parasitierende Pilze ernähren sich von lebendem Gewebe und müssen ihre Entwicklung bis zum Absterben der Pflanze vollendet haben. Fakultative Parasiten können sich sowohl von lebenden als auch von totem Gewebe ernähren. Symbionten, wie die Mykorrhiza, leben in enger Gesellschaft mit den Pflanzen. Pilze besitzen einen oder mehrere Zellkerne pro Zelle und sind homo- oder heterokaryotisch. Mindestens in einem Lebensstadium haben Pilze eine feste Zellwand. Diese besteht meist aus Chitin oder in einigen Fällen wie den Oomycota aus Cellulose. Der vegetative Pilzkörper (Thallus) ist meist haploid, seltener diploid. Der Thallus niederer Pilze (u.a. Myxomycota) besteht aus amöboiden Zellen oder Plasmodien (nacktem Protoplasma mit vielen Kernen). Eumycota haben Sprosszellen, wie die Hefen (z.B. *Saccharomyces cerevisiae*), oder bilden ein Myzel das aus fadenförmigen Hyphen besteht. Durch die Aggregation von Hyphen können spezielle Organe für die Vermehrung (Fruchtkörper) oder zum Überdauern ungünstiger Umweltbedingungen (Sklerotien) gebildet werden. Die Fortpflanzung und Vermehrung erfolgt meist durch Sporen; asexuell mit Konidien, Uredosporen, Sporangiosporen, Chlamydosporen und Zoosporen, sexuell mit Oosporen, Ascosporen, Zygosporien und Basidiosporien.

[0004] Bis heute sind ca. 100 000 verschiedene Pilzarten bekannt. Von diesen treten allerdings nur 5 % als Pflanzenpathogene auf. Die Basidiomycota sind eine Abteilung der echten Pilze, welche durch die Bildung einer besonderen Struktur, der Basidie, an der die Basidiosporien reifen, charakterisiert sind. Zu den Basidiomycota gehören auch die allgemein bekannten Hutpilze. Die Basidiomycota sind überwiegend heterothallisch und selbststeril. Die Kopulation erfolgt durch Somatogamie. Dabei verschmelzen zwei kompatible, haploide, einkernige Myzelien oder Sporidien miteinander. Das daraus hervorgehende, dikaryotische Myzel stellt über einen langen Zeitraum die Hauptlebensphase dar. Die beiden einzigen phytopathogenen Gattungen der Basidiomycota sind die Brandpilze (Ustilages) und die Rostpilze (Uredinales). Brandpilze befallen nur Angiospermen und besaßen früher eine große ökonomische Bedeutung. Heute werden sie durch entsprechende Wirkstoffe und strenge Kontrollen des Saatgutes erfolgreich bekämpft. Eine größere Bedeutung haben heute noch die Rostpilze. Sie sind biotroph und können einen komplizierten Entwicklungszyklus mit bis zu fünf verschiedenen Sporenstadien (Spermatium, Äzidiospore, Uredospore, Teleutospore und Basidiospore) haben. Rostpilze die alle Sporenstadien ausbilden, werden als makrozyklische Roste bezeichnet. Fehlen einige Stadien spricht man von mikrozyklischen Rosten. Bei den ‚imperfekten Rosten‘ fehlen die Basidiosporien. Einige Roste wechseln während ihrer Entwicklung den Wirt. Diese werden als heterözisch bezeichnet. Der Wirtswechsel kann mit einem Kernphasenwechsel verbunden sein. Autözische Roste durchlaufen dagegen ihre gesamte Entwicklung an einem Wirt. Ein klassisches Beispiel für einen makrozyklischen, heterözischen Rost ist der Getreideschwarzrost *Puccinia graminis*. *P. graminis* befällt in seinem dikaryotischen Stadium vor allem Weizen. Der Haplont ist auf der Berberitze pathogen (Börner H., Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, Ulmer Verlag Stuttgart, 1997; Sitte P. et al., Strasburger - Lehrbuch der Botanik, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1998; Entrup N.L. et al., Lehrbuch des Pflanzenbaues, Thomas Mann Verlag, Gelsenkirchen, 2000).

[0005] Bei der Infektion von Pflanzen mit pathogenen Pilzen beobachtet man im Allgemeinen unterschiedliche Phasen. Die ersten Phasen der Interaktion zwischen phytopathogenen Pilzen und ihren potentiellen Wirtspflanzen sind für die Besiedlung der Pflanze durch den Pilz entscheidend. Im ersten Schritt der Infektion heften sich die Sporen an die Pflanzenoberfläche an, keimen aus und der Pilz dringt in die Pflanze ein. Für das Anheften der Sporen ist entweder ein aktiver Metabolismus nötig, dies ist bei *Colletotrichum graminicola* der Fall, oder sie erfolgt passiv, wie bei *Magnaporthe*

grisea. Bei letzterem führt Feuchtigkeit zur Ausscheidung eines ‚Klebeschleimes‘ mit dem sich die Spore anheftet (Howard R.J. et al., Annu. Rev. Microbiol. 50, 491 (1996)). Die Keimung der Spore wird durch unspezifische Induktoren wie Wasser, Nährstoffe, Ethylen oder seltener wie bei *Phyllosticta ampellicida*, durch hydrophobe Oberflächen induziert (Kuo K. et al., Fungal Genet. Biol. 20, 18 (1996)). Einige Pilze bilden zwei Keimschläuche aus, wie der Getreidemehltau *Blumeria graminis*, andere Pilze hingegen nur einen (Green J.R. et al., The powdery mildews, a comprehensive treatise; The formation and function of infection and feeding structures, APS Press, 2002). Pilze können durch schon vorhandene Öffnungen wie Stomata, Lentizellen, Hydatoden und Wunden in die Pflanze eindringen, oder sie penetrieren die Epidermis der Pflanze direkt durch mechanische Kraft und mit der Hilfe von Zellwand auflösenden Enzymen. Zum Eindringen in die Pflanze werden spezielle Infektionsstrukturen gebildet. Diese Druckorgane werden als Appressorien bezeichnet und erlauben dem Pilz über einem diskreten Punkt einen hohen Druck aufzubauen. Es wird geschätzt das *M. grisea* mit seinem Appressorium Drücke von 80 bar erreicht (Howard R.J. et al., Annu. Rev. Microbiol. 50, 491 (1996)). Die meisten Rostpilze dringen dagegen über die Spaltöffnungen in die Pflanze ein. Der Sojarost *Phakopsora pachyrhizi* penetriert die Epidermis der Pflanze direkt und ist damit in seinem Penetrationsverhalten dem Getreidemehltau *B. graminis* ähnlich (Koch E. et al., Phytopath. Z. 106, 302 (1983); Tucker S.L. et al., Annu. Rev. Phytopathol. 39, 385 (2001); Green J.R. et al., The powdery mildews, a comprehensive treatise; The formation and function of infection and feeding structures, APS Press, 2002).

[0006] Phytopathogene Pilze besiedeln durchaus nicht immer die vollständige Pflanze, sondern nur bestimmte Bereiche oder Gewebe. Nach der erfolgreichen Invasion der Pflanze verfolgen phytopathogene Pilze verschiedene Ernährungsstrategien. Pertotrophe bzw. nekrotrophe Pathogene töten die Wirtszellen durch extrazelluläre Enzyme oder Toxine und ernähren sich durch Abbau der toten Zellen. Einige Gattungen mit pertotropher Ernährung sind die Fusarien sp., *Alternaria* sp. und *Cochliobolus*. Die Mehrzahl der Pilze verfolgt diese Ernährungsstrategie. Die biotrophen phytopathogenen Pilze, wie der Mehltau und viele Rostpilze, sind für ihre Ernährung auf den Stoffwechsel lebender Zellen angewiesen. Eine Zwischenstellung haben die hemibiotrophen pathogenen Pilze zu denen die Gattungen *Phytophthora* und *Peronospora* zählen. Diese sind meist zu Beginn ihrer Entwicklung biotroph und gehen erst zu einer pertotrophen Lebensweise über, wenn ihre Entwicklung weit fortgeschritten ist (Prell H.H., Interaktionen von Pflanzen und phytopathogenen Pilzen, Gustav Fischer Verlag, Jena, 1996). Um der Infektion zu entgehen, haben die Pflanzen komplexe Abwehrmechanismen entwickelt. Eine andere Zwischenstellung nimmt beispielsweise der Sojarost ein, der die Epidermis direkt penetriert, worauf die penetrierte Zelle nekrotisch wird; nach der Penetration geht er zu einer obligat-biotrophen Lebensweise über. Die Untergruppe der biotrophen Pilzpathogene, die im wesentlichen eine solche Infektionsstrategie zur Anwendung bringt, wird für die Zwecke der vorliegenden Beschreibung als "heminekrotroph" bezeichnet.

[0007] Es ist wichtig, hervorzuheben, dass Pflanzen während ihrer Entwicklung dem ständigen Angriff zahlreicher phytopathogener Organismen ausgesetzt sind. Trotzdem ist die Besiedlung der Pflanze durch phytopathogene Organismen eher die Ausnahme als die Regel. Bevor ein Pathogen die Pflanze befallen kann, muss es eine Reihe von Barrieren überwinden. Häufig hat das Pathogen spezielle, an die Pflanze angepasste Pathogenitätsfaktoren, sogenannte Virulenzfaktoren, entwickelt, um diese Barrieren zu überwinden. In diesem Fall wird die Pflanze eine Wirtspflanze des Pathogens, d.h. es ist virulent auf der Pflanze. Es besteht eine Basiskompatibilität zwischen der Pflanze und dem Pathogen. Dies bedeutet, dass die zur Besiedlung erforderlichen physiologischen und biochemischen Voraussetzungen bereits bestehen oder hergestellt werden (Prell H.H., Interaktionen von Pflanzen und phytopathogenen Pilzen, Gustav Fischer Verlag, Jena, 1996). Das Pathogen entwickelt sich bei einer kompatiblen Interaktion auf Kosten der Pflanze und bewirkt so die Ausbildung von Krankheitssymptomen wie Welken, Nekrosen und Chlorosen. Besteht eine Basiskompatibilität kann das Pathogen aber trotzdem noch von der Pflanze abgewehrt werden, wenn in dieser eine Resistenzmutation stattgefunden hat. Die dadurch erworbene Resistenz der Pflanze wird als Wirtsresistenz bezeichnet. Sie ist nur gegen ein bestimmtes einzelnes Pathogen gerichtet und kann von diesem leicht überwunden werden. Meist, aber nicht immer, handelt es sich dabei um biotrophe Pathogene. Die Wirts-resistenz kann weiter in eine nichtrassenspezifische horizontale Resistenz, an der meist mehrere Gene beteiligt sind, und in eine rassenspezifische vertikale Resistenz unterteilt werden. Letztere ist nur gegen bestimmte einzelne Rassen eines Pathogens wirksam. Ein Großteil der Pathogene wird von der Pflanze von vornherein abgewehrt. Dieses Phänomen wird als Basisinkompatibilität oder Nicht-Wirtsresistenz ("non-host resistance") bezeichnet. Im Gegensatz zu der Wirtsresistenz beruht die Nicht-Wirtsresistenz auf einer Reihe von Ursachen und nicht auf einzelnen Genen. Zum einen können dem Pathogen die notwendigen Pathogenitätsfaktoren fehlen oder die Pflanze ist in der Lage das Pathogen zu erkennen und erfolgreich abzuwehren. Ein weiterer Begriff, der vor allem eine Bedeutung für die Landwirtschaft hat, ist die Toleranz. Eine Pflanze ist gegenüber einem Pathogen tolerant, wenn sie zwar befallen werden kann, der Befall allerdings nicht zur Ausbildung von Krankheitssymptomen und zu keiner Ertragsminderung führt (Prell H.H., Interaktionen von Pflanzen und phytopathogenen Pilzen, Gustav Fischer Verlag, Jena, 1996). Ein Erzeugen bzw. ein Erhöhen einer Resistenz soll für die Zwecke der Beschreibung der vorliegenden Erfindung sowohl eine Erhöhung oder Erzeugung von jeglicher Art Resistenz als auch Toleranz umfassen, d.h. insbesondere alle Fälle der erhöhten Toleranz oder Resistenz, die zu einer Verminderung der Ertragseinbuße unter Einwirken des Pathogens führen.

[0008] Bei Resistenzreaktionen von Pflanzen werden mit dem Begriff Resistenzfaktoren Strukturen, Substanzen und

Prozesse zusammengefasst, die den Befall der Pflanze durch potentielle Pathogene verhindern oder hemmen. Sind die Resistenzfaktoren bereits konstitutiv in der Pflanze vorhanden, werden sie als präformierte Resistenzfaktoren bezeichnet. Induzierte Resistenzfaktoren werden erst gebildet, wenn es zu einer Erkennungsreaktion zwischen der Pflanze und dem potentiellen Pathogen gekommen ist. Die Erkennung kann als eine Signal-Sensor-Reaktion beschrieben werden (Elicitor-Rezeptor-Modell, Keen N.T. et al., *Phytopathology* 62, 768 (1972)). Das Signal sind pflanzliche oder vom Pathogen stammende Stoffe, sogenannte Elicitoren, die an einen für den jeweiligen Elicitor spezifischen Sensor oder Rezeptor binden. Diese Bindung löst einen oder mehrere Effektoren aus, die z.B. Signaltransduktionsketten darstellen können und Resistenzreaktion induzieren. Eine ganze Reihe von Stoffen wirken als Elicitoren. Zu diesen gehören Proteine, Glykoproteine, Glykane und Lipide (Garcia Brugger et al., *MPMI* 19, 711 (2006)). Auch Abbauprodukte der Pflanzenzellwand, die durch Enzyme des Pathogens oder aber auch durch Verwundung der Pflanze freigesetzt werden, können eine Resistenzreaktion induzieren. In diesem Zusammenhang wird häufig von einem Avirulenzfaktor des Pathogens und dem zugehörigen Resistenzgen der Pflanze gesprochen ("Gen-für-Gen-Hypothese", Flor, *J. Agric. Res.* 74, 241 (1947)). Das Pathogen kann durch strukturelle Veränderungen des Elicitors, Maskierung der Erkennungssequenz oder durch Konkurrenz mit einem anderen Stoff um die Bindungsstellen am Elicitor oder Rezeptor die Erkennung durch die Pflanze verhindern.

[0009] Präformierte Resistenzfaktoren bilden die erste Abwehr gegen die Besiedlung durch pathogene Organismen. Diese Faktoren können morphologischer Natur sein oder Substanzen des sekundären pflanzlichen Stoffwechsels (Phytoanticipine) darstellen. Morphologische Faktoren, die eine Besiedlung verhindern sind die Blattbehaarung, die Dichte und Form der Stomata sowie die Beschaffenheit der Kutikula und der Zellwand.

[0010] Das Erkennen des Pathogens durch die Pflanze kann auch zur Induktion von Resistenzfaktoren, d.h. morphologischer sowie physiologischer Resistenzreaktionen führen. Viele dieser Reaktionen sind die Folge einer Signalkaskade. Signalmoleküle, wie Ca^{2+} , NO, Reaktive Sauerstoffverbindungen und Phytohormone, wie Ethylen und Jasmonat, sind an den Kaskaden beteiligt und tragen zu der Vernetzung der Signalwege bei. Als Resistenzreaktionen bei denen morphologische Strukturen in der Pflanzenzelle verändert werden, sind die Bildung von Zellwandappositionen (Papillen), Kork- und Abscissionsschichten, Thyllen und die Imprägnierung der Zellwand zu nennen. Der Beginn der Penetration durch einen pathogenen Pilz kann die Bildung von Papillen auslösen. Gegenüber der potentiellen Penetrationstelle werden an der inneren Zellwand Lignin, Kallose, Suberin und hydroxyprolinreiche Proteine abgelagert und miteinander vernetzt. Die Kallose kann durch Einlagerung von Anillinblau angefärbt werden. Zusätzlich akkumulieren in der gebildeten Papille Phenole, reaktive Sauerstoffverbindungen und Hydrolasen (Hückelhoven R. et al., *Plant Physiol.* 119, 1251 (1999); Assaad F.F. et al., *Mol. Biol. of the Cell*, 15, 5118 (2004)). Die Papillenbildung führt zu einer erheblich verdickten Zellwand und kann das Eindringen des pathogenen Pilzes verhindern. Physiologische Prozesse die zu der induzierten Resistenz beitragen sind die Depolarisierung der Zellmembran, der ‚Oxidative burst‘ (oxidative Stressantwort), die ‚Hypersensitive Reaktion‘, die Bildung von Phytoalexinen und die Expression von ‚Pathogenesis related proteins‘ (PR-Proteine). Eine der ersten Reaktionen auf den Kontakt mit einem Elicitor ist die Depolarisation der Zellmembran. Dabei kommt es zu einem starken Efflux von Cl^- und K^+ - Ionen verbunden mit einem deutlichen Wasserverlust. Es wird angenommen, dass die Depolarisation eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration, eines wichtigen Signalmoleküls, auslöst (Ward J.M. et al., *Plant Cell* 7, 833 (1995)) und eine Rolle bei der ‚Hypersensitiven Reaktion‘ (HR) spielt (Wendehenne D. et al., *Plant Cell* 14, 1937 (2002)). Die HR in Pflanzen ist eine Form des programmierten Zelltods. Sie ermöglicht der Pflanze den Pilz auch noch nach dem Eindringen zu stoppen, indem sie ihm die Nahrungsgrundlage entzieht. Der Verlauf der HR scheint dabei von der Kombination von Pflanze und Pathogen abhängig zu sein. Für die Induktion der HR scheint aber die Proteinbiosynthese, ein intaktes Cytoskelett und Salicylsäure nötig zu sein (Heath M., *Plant Mol. Biol.* 44, 321 (2000)).

[0011] Eine sehr schnelle Reaktion auf das Pathogen ist der ‚Oxidative burst‘, die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen, wie das Superoxidanion O_2^- , das Hydroxylradikal OH \cdot und Wasserstoffperoxid. Diese Verbindungen werden durch verschiedene Oxidasen gebildet. Das Hydroxylradikal wirkt lokal, während H_2O_2 über die Membranen diffundieren kann. Beide oxidieren polyungesättigte Fettsäuren und können so Membranen zerstören (Grant J.J. et al., *Plant Physiol.* 124, 21 (2000)). Für H_2O_2 wird auch eine Funktion in der Genregulation vermutet. Außerdem unterstützen die Verbindungen die Abwehrreaktionen durch Vernetzung der Zellwandkomponenten, verstärkte Lignifizierung und haben eine toxische Wirkung auf Pathogene (Garcia-Brugger A. et al., *MPMI* 19, 711 (2006)). Nicht zuletzt führt der Angriff des Pathogens zur Expression von Genen die für PR-Proteine und Phytoalexine codieren. PR-Proteine sind eine heterogene Gruppe von Proteinen, die toxisch auf eindringende Pilze wirken. Als Phytoalexine werden niedermolekulare antimikrobiell wirksame Substanzen bezeichnet, deren Synthese durch biotischen oder abiotischen Stress ausgelöst wird (Prell H.H., *Interaktionen von Pflanzen und phytopathogenen Pilzen*, Gustav Fischer Verlag, Jena, 1996; van Loon L.C. et al., *Physiol. Mol. Plant Physiol.* 55, 85 (1999)). Die beschriebenen Reaktionen laufen zum Teil sowohl bei der Interaktion des Pathogens mit einer Wirts- als auch einer Nicht-Wirtspflanze ab. Entscheidend für die Abwehr des Pathogens ist die Qualität der Erkennung und die Quantität und Geschwindigkeit der Resistenzreaktion (Thordal-Christensen H., *Current Opinion in Plant Biology* 6, 351 (2003)).

[0012] Eine Pflanzenkrankheit, die in der letzten Zeit an Bedeutung gewonnen hat, ist der Sojabohnenrost. Die

Krankheit wird durch die pathogenen Rostpilze *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow) und *Phakopsora meibomia* (Arthur) verursacht. Sie gehören zu der Klasse der Basidiomycota, Ordnung Uredinales und zu der Familie der Phakopsoraceae. Die beiden Spezies sind sehr eng miteinander verwandt. Die intergenen Sequenzen ihrer rRNA-Gene zeigen eine Ähnlichkeit von 80 % (Frederick R.D. et al., *Phytopathology* 92, 217 (2002)). Die Arten werden anhand morphologischer Charakteristika der Teliosporen unterschieden (Ono Y. et al., *Mycol. Res.* 96, 825 (1992)). Beide Rostpilze infizieren ein weites Spektrum von Wirtspflanzen. *P. pachyrhizi*, der auch als asiatischer Sojarost bezeichnet wird, ist auf Sojabohnen (*Glycine max*) das aggressivere Pathogen und besitzt daher, zumindest derzeit, eine größere Bedeutung für die Landwirtschaft. *P. pachyrhizi* kann unter natürlichen Bedingungen 31 Arten aus 17 Familien der Leguminosae infizieren und ist in der Lage unter kontrollierten Bedingungen auf weiteren 60 Arten zu wachsen (Sinclair et al. (eds.), *Proceedings of the soybean rust workshop* (1995), National Soybean Research Laboratory, Publication No. 1 (1996); Rytter J.L. et al., *Plant Dis.* 87, 818 (1984)). *P. meibomia* wurde im Karibischen Bassin und Puerto Rico gefunden, bisher ohne größere Schäden zu verursachen.

[0013] Ursprünglich wurde *P. pachyrhizi* 1902 in Japan entdeckt. Von dort breitete sich *P. pachyrhizi* über weite Teile Asiens sowie über Indien und Australien aus, um schließlich 1996 Afrika zu erreichen. Der Pilz gelangte 2001 nach Süd-Amerika und trat erstmals 2004 in Amerika auf (Sconyers E.L. et al., www.ers.usda.gov/Features/SoyBeanRust/ (2005)). Besonders in Süd-Amerika verursacht *P. pachyrhizi* große Ertragseinbußen von bis zu 80 %. Es wird geschätzt das allein 1,5 Mio. t der brasilianischen Sojabohnenernte 2005/2006 der Infektion mit Sojabohnenrost zum Opfer gefallen sind. *P. pachyrhizi* ist ein hemicyclischer Rost, der drei Arten von Sporen bildet. Eine Bildung von Teliosporen wurde in Asien gegen Ende der Vegetationsperiode beobachtet (Yeh C.C. et al., *Phytopathology* 71, 1111 (1981)). Die Bildung von Basidiosporen ist dagegen nur unter Laborbedingungen bekannt. Die wichtigste Sporenform sind die Uredosporen, die während der gesamten Vegetationsperiode gebildet werden und der Verbreitung dienen. Diese Sporen werden in großen Mengen gebildet und können mit dem Wind und Regen weite Strecken zurücklegen. *P. pachyrhizi* ist obligat biotroph. Gelangt eine Uredospore auf einen geeigneten Wirt, keimt diese mit einem einzelnen Keimschlauch aus. An dessen Ende entsteht ein Appressorium, welches schnell die Größe der Spore erreicht. Mit dem Appressorium ist der Pilz in der Lage großen Druck aufzubauen und kann mit einer Penetrationshyphe die Epidermiszellen direkt penetrieren. Die Penetrationshyphe von *P. pachyrhizi* durchwächst die Epidermiszelle und bildet, sobald sie den interzellulären Raum im Blatt erreicht, das erste Septum. Sie wächst nun als primäre Hyphe im Blatt weiter. Bereits 24 - 48 h nach der Infektion wird die erste Haustorienmutterzelle durch ein Septum abgeteilt und ein sackförmiges Haustorium in einer Mesophyllzelle des Blattes gebildet. Dabei wird die Zellwand der Mesophyllzelle penetriert, das Plasmalemma aber nur eingestülpt, so dass die Zelle am Leben bleibt und als Quelle für Nährstoffe dienen kann. Diese gelangen von der Membran der lebenden Wirtszelle über die extrahaustoriale Matrix zum Haustorium. Die zu Anfang penetrierte Epidermiszelle wird kurze Zeit nach der Penetration nekrotisch. Diese Art und Weise der Infektion eines biotrophen Pathogens, wie sie *P. pachyrhizi* vollführt, wird daher als "heminekrotroph" bezeichnet. Nur 11 - 12 Tage nach der Infektion werden die ersten Uredosporen gebildet und der Zyklus kann von neuem beginnen (Koch E. et al., *Phytopath. Z.* 106, 302 (1983)).

[0014] Die landwirtschaftlich genutzte Sojabohne *Glycine max* (L.) Merr. gehört zur Familie der Leguminosae, Unterfamilie Papilionoideae, Tribus Phaseoleae, Gattung *Glycine* Willd. und Untergattung Soja (Moench). Die Sojabohne wird in über 35 Ländern angebaut. Einige der wichtigsten Anbauggebiete befinden sich in den USA, China, Korea, Argentinien und Brasilien. Sie gilt als eine der ältesten Kulturpflanzen und wurde in China zwischen dem 11. und 17. Jahrhundert erstmals domestiziert (Hymowitz T., *Econ. Bot.* 24, 408 (1970)). Im Jahr 1765 wurde sie in die USA eingeführt, heute eines der größten Anbauggebiete von Soja. Wilde Sojabohnenarten sind in China, Korea, Japan, Taiwan und der früheren UDSSR zu finden. Morphologische, cytologische und molekulare Hinweise deuten auf *G. soja* als Vorfahre der Kulturform *G. max* hin. Die Sojabohne als subtropische Pflanze bevorzugt eine mittlere Jahrestemperatur von 5.9 - 27°C und ist nicht frostresistent (OECD, Consensus document on the biology of *Glycine max* (L.) Merr. (Soybean); Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology No. 15, ENV/JM/MONO(2000)9). Heute ist die Sojabohne eine wichtige Öl- und Proteinquelle. Diese umfangreiche Verwendung von Soja in der Nahrungsmittelproduktion unterstreicht die Bedeutung einer effektiven Bekämpfung des Sojarostes.

[0015] Die Infektion der Sojapflanzen durch *P. pachyrhizi* erfolgt durch Wind verbreitete Uredosporen. Als erste Symptome sind auf der Blattoberseite kleine gelbe bis rotbraune Läsionen zu erkennen, die sich später weiter ausbreiten bis das gesamte Blatt schließlich chlorotisch wird und abstirbt. Bei einer fortgeschrittenen Infektion treten die Läsionen auf der ganzen Pflanze auf. Die ersten Uredien mit 100-200 µm Durchmesser treten 10-14 Tage nach der Infektion auf der Blattunterseite auf und können drei bis sechs Wochen lang Sporen produzieren. Telia werden subepidermal gebildet und treten meist an der Peripherie der Läsionen auf. Die Sporen sind zunächst gelb bis braun und werden später schwarz. Die ersten Symptome treten häufig zuerst auf den älteren Blättern auf. Die schnelle Entwicklung der Krankheit korreliert mit dem Beginn der Blüte (R1+) und zerstört schließlich das gesamte Blattwerk. Die weitgehende Zerstörung der photosynthetisch aktiven Fläche und die Entnahme von Wasser und Nährstoffen durch den Pilz führen zu einer verringerten Produktivität der Pflanze (Sconyers E.L. et al., www.ers.usda.gov/Features/SoyBeanRust/ (2005)).

[0016] Für die Keimung benötigt *P. pachyrhizi* Feuchtigkeit in Form von Tau oder ähnlichem auf der Blattoberfläche. Besonders gefördert wird der Pilz durch häufigen Regen und Temperaturen zwischen 15 und 29 °C (Sconyers E.L. et

al., [www.ers.usda.gov/Features/SoyBeanRust/\(2005\)](http://www.ers.usda.gov/Features/SoyBeanRust/(2005))). Die Krankheit beginnt häufig an einzelnen Stellen und breitet sich anschließend schnell über das ganze Feld aus. Der Pilz ist autözisch d.h. er benötigt keinen Wirtswechsel für seine Entwicklung und kann auf seinen zahlreichen alternativen Wirtspflanzen gut überdauern. In den USA wird vor allem, das aus Japan stammende, Kudzu (*Pueraria lobata*) als potentielle Wirtspflanze angesehen, auf der *P. pachyrhizi* überwintern und im Frühjahr neues Inokulum liefern kann.

[0017] Zurzeit ist eine Bekämpfung von *P. pachyrhizi* im Feld nur mit Fungiziden möglich. Sojapflanzen mit einer Resistenz gegen das ganze Spektrum der Isolate sind nicht verfügbar. Bei der Suche nach resistenten Pflanzen wurden vier dominante Gene Rpp1-4 entdeckt, die eine Resistenz von Soja gegen *P. pachyrhizi* vermitteln, diese ist aber nur Isolat-spezifisch (Hartwig E.E. et al., *Crop Science*, 23, 237 (1983); Hartwig E.E., *Crop Science* 26, 1135 (1986)). Da die Resistenz nur auf einzelnen Genen beruhte, ging sie schnell verloren. Einzig die von Rpp4 vermittelte Resistenz wurde bisher nur unter Gewächshausbedingungen gebrochen (Posada-Buitrago M.L. et al., *Fungal Genetics and Biology* 42, 949 (2005)). Die Nutzung potentieller Resistenzquellen aus Vertretern der mehrjährigen ausdauernden Untergattung Soja ist begrenzt (Hartman G.I. et al., *Plant Disease* 76, 396 (1992)). Bisher waren bei allen Kreuzungen die Nachkommen steril (Singh R. et al., *Wendl. Theor. Appl. Genet.* 74, 391 (1987)).

[0018] Für eine effektive Bekämpfung des Sojarostes mit Fungiziden ist eine tiefe Applikation in das Blattwerk der Pflanzen wichtig, da die Infektion als erstes an den unteren Blättern auftritt. Bewährt hat sich eine zweimalige Behandlung. Ein Nachteil der dabei verwendeten Fungizide ist, dass aufgrund ihres spezifischen Wirkungsmechanismus leicht Resistenzen entstehen können. Eine potentielle Alternative zum Fungizideinsatz ist die Verwendung von Glyphosatresistenten Sojapflanzen. In einem Gewächshausversuch wurde nach der Behandlung der Sojapflanzen mit dem Herbizid drei Tage vor der Inokulation eine Reduktion der vom Rost verursachten Läsionen um 46 - 70 %, beobachtet (Feng C.C.P. et al., *PNAS* 102, 17290 (2005)). Es ist jedoch abzuwarten, ob diese Wirkung auch in Feldversuchen erhalten bleibt.

[0019] *P. pachyrhizi* gewinnt in den letzten Jahren eine immer größere Bedeutung als Schädling im Sojaanbau. Es besteht im Stand der Technik daher eine Nachfrage, Methoden zur Bekämpfung des Pilzes zu entwickeln. Von der Züchtung ist dabei vorerst kein Beitrag zu erwarten, da die vorhandenen Resistenzquellen nicht zugänglich sind. Die Behandlung mit Fungiziden hat eine begrenzte Wirkung und ist nur effektiv, wenn die Krankheit noch nicht ausgebrochen ist. Aus diesen Gründen bietet sich insbesondere das Pathosystem Soja mit *P. pachyrhizi* für einen transgenen Ansatz an. Für einen aussichtsreichen Ansatz ist es zunächst wichtig den Infektionsverlauf und die Reaktion der Pflanze besonders in den ersten Stadien der Infektion genau zu kennen. Potentielle Resistenz vermittelnde Kandidatengene müssen identifiziert und ihre Wirkung in der Interaktion zwischen der Pflanze und dem Pathogen charakterisiert werden. Die stabile Transformation von Pflanzen ist sehr zeit- und kostenintensiv, daher wird eine transiente Transformation, die eine Charakterisierung der Pflanze-Pathogen Interaktion auf dem Level der einzelnen Zelle ermöglicht, bevorzugt. Als Methode bietet sich dabei die transiente ballistische Transformation von Blättern an. Die Nicht-Wirtsresistenz ist bei Pflanzen besonders effektiv und dauerhaft und beruht auf einer im Vergleich zur kompatiblen Reaktion erhöhten Quantität und Geschwindigkeit der Resistenzreaktion. Eine Charakterisierung entscheidender Gene in der Nicht-Wirtsresistenz kann so der Identifizierung potentieller Kandidatengene für die Herstellung resistenter Pflanzen dienen. Um daher auch die Reaktion einer Nicht-Wirtspflanze auf den Sojarost zu untersuchen, wurde in den Beispielen das System Gerste (*Hordeum vulgare*) mit *P. pachyrhizi* gewählt, da Gerste eine gut beschriebene Modellpflanze ist. Zusätzlich ist das Pathosystem von Gerste mit *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (Bgh) und dem inkompatiblen *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (Bgt) sehr gut untersucht. Obwohl Bgh und *P. pachyrhizi* in mancher Hinsicht Unterschiede aufweisen, haben sie zumindest phänotypisch einige Schritte zu Beginn des Infektionsvorganges gemeinsam. So kann die Analyse in Gerste Aufschluss über die Mechanismen der Nicht-Wirtsresistenz gegenüber *P. pachyrhizi* im Vergleich zur Wirts-Resistenz der Gerste geben. In transient transformierten Gerstenblättern wurden daher Kandidatengene auf ihre Effekte in der Resistenz gegenüber *P. pachyrhizi* geprüft. Mit der transienten ballistischen Transformation steht eine Methode zur Verfügung eine Reihe von potentiell in der Resistenzantwort beteiligter Genen in dem Pathosystem Gerste mit *P. pachyrhizi* zu untersuchen.

[0020] Der programmierte Zelltod („programmed cell death“ PCD) ist ein wichtiger Prozess in der Entwicklung und der Stressantwort von Pflanzen und Tieren. Einige morphologische und biochemische Veränderungen der Zelle, wie Chromatinkondensation, Schrumpfen des Cytoplasmas und DNA-Fragmentierung scheinen Pflanzen und Tieren dabei gemeinsam zu sein (Lam E. et al., *Nature* 411, 848 (2001)). Eine klare Trennung des PCD und der durch biotischen oder abiotischen Stress hervorgerufenen HR ist nicht möglich (Heath M., *Plant Mol. Biol.* 44, 321 (2000)). Ein Aktivator des PCD in Tieren ist BAX. BAX bildet in der äußeren Mitochondrienmembran Kanäle und bewirkt die Abgabe von Cytochrom c. Dieses löst eine Caspase Kaskade und damit die Proteolyse von, für die Zelle lebensnotwendigen Proteinen aus (Green D.R. et al., *Science* 281, 1309 (1998)). Die Überexpression von BAX in Tabak (*N. tabacum*, Lacomme C. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96, 7956 (1999)) und *Arabidopsis thaliana* (Kawai-Yamada M. et al., *Plant Cell* 16, 21 (2004)) verursacht einen PCD und weist damit auf ähnliche Mechanismen bei Pflanzen und Tieren hin. Bisher konnten aber keine Homologe von BAX in Pflanzen identifiziert werden. Dagegen ist ein zu BAX antagonistischer Regulator des PCD, der BAX Inhibitor-1 (BI-1), in Pflanzen, Tieren und anderen Organismen, wie Hefe, konserviert. Ähnliche Proteine wurden

inzwischen in *A. thaliana*, *H. vulgare*, *Brassica napus*, *Brassica oleracea*, *Oryza sativa* und *N. tabacum* identifiziert (Hückelhoven R., Apoptosis 9, 299 (2004)). In Experimenten mit BI-1-GFP Fusionsproteinen wurde eine Lokalisation von BI-1 in der Membran des Endoplasmatischen Refikulum (ER) und der Kernmembran beobachtet (Eichmann R. et al., Mol. Plant Microbe Interact. 17, 484 (2004)). Das Protein hat eine Größe von 25 - 27 kDa und besitzt 6 - 7 transmembranale Domänen. Der wahrscheinlich im Cytoplasma lokalisierte C-Terminus (Bolduc N. et al., Planta 216, 377 (2003)) ist essentiell für die Funktion von BI-1 (Kawai-Yamada et al., Plant Cell 16, 21 (2004)). Die transmembranalen Domänen bilden möglicherweise einen Ionenkanal (Bolduc N. et al., Planta 216, 377 (2003)). So könnte, aufgrund der Speicherfunktion des ER für Ca^{2+} , BI-1 eine Funktion in der Regulation des cytosolischen Ca^{2+} -Spiegels und/oder des Redoxstatus der Zelle haben (Xu Q. et al., Mol. Cell 18, 1084 (1998); Balduc N. et al., FEBS Lett. 532, 111 (2003); Hückelhoven R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 29, 5555 (2003); Matsumura H. et al., Plant J. 33, 425 (2003)). In tierischen Zellen gibt es keine direkte physikalische Interaktion von BI-1 mit Bax. Aber BI-1 interagiert mit anderen Regulatoren des PCD (Xu Q. et al., Mol. Cell 18, 1084 (1998)). Wahrscheinlich interagiert BI-1 in Pflanzen ebenfalls mit anderen Regulatoren des PCD und beeinflusst so die Resistenzreaktionen. In Arabidopsis kann BI-1 den BAX und den H_2O_2 induzierten PCD unterdrücken (Baek D. et al., Plant Mol. Biol. 56, 15 (2004); Kawai-Yamada M. et al., Plant Cell 16, 21 (2004)). Es reguliert daher wahrscheinlich die Prozesse in einer tieferen Ebene als der oxidativen Stressantwort (Kawai-Yamada M. et al., Plant Cell 16, 21 (2004)).

Die Expression von BI-1 wird durch biotischen und abiotischen Stress, wie Pathogenangriff oder Verwundung, aber auch in alternden Geweben induziert (Balduc N. et al., FEBS Lett. 532, 111 (2003); Hückelhoven R., Apoptosis 9, 299 (2004)). In Arabidopsis sind die mRNA-Level von BI-1 nach Hitzeschock erhöht (Watanabe N. et al., Plant J. 45, 884 (2006)). In Tomate (*Lycopersicon esculentum*) wirkt H_2O_2 und in Arabidopsis H_2O_2 und Salicylsäure induzierend auf die BI-1 Expression (Hückelhoven R., Apoptosis 9, 299 (2004); Kawai-Yamada M. et al., Plant Cell 16, 21 (2004)). Dies weist auf eine Funktion von BI-1 in der Pathogenabwehr hin, denn beide Substanzen spielen bei dieser eine wichtige Rolle (Prell H.H., Interaktionen von Pflanzen und phytopathogenen Pilzen, Gustav Fischer Verlag, Jena, 1996).

[0021] Dementsprechend löst die Infektion von Gerste mit Bgh oder Bgt eine Steigerung der Expression von BI-1 aus (Hückelhoven R. et al., Plant Mol. Biol. 47, 739 (2001); Eichmann R. et al., Mol. Plant Microbe Interact. 17, 484 (2004)). In Reis folgt die Expression nach der Infektion mit *M. grisea* einem biphasischen Verlauf. Sie ist zunächst leicht erhöht, wird aber 12 h nach der Infektion wieder reduziert, um anschließend wieder zu steigen (Matsumura H. et al., Plant J. 33, 425 (2003)). Die BI-1 Expressionssteigerung in Arabidopsis Zellen nach der Behandlung mit Fumonisin B1 (Watanabe N. et al., Plant J. 45, 884 (2006)) und die Reduktion der BI-1 Expression nach der Behandlung von Reiszellen mit *M. grisea* Elicitorextrakt zeigt, dass die Expressionsmuster abhängig von dem induzierenden Faktor und der Pflanze sehr unterschiedlich sein können. Die Expressionsmuster deuten auf eine Rolle von BI-1 in der Regulation des stressinduzierten PCD bzw. HR und der Resistenzreaktion gegen Pathogene hin. Die Beeinflussung der HR kann die Resistenz einer Pflanze erhöhen, vor allem, wenn es sich bei den Pathogenen um perito- oder hemibiotrophe Pilze handelt. Eine Überexpression von BI-1 in Karotten (*Daucus carota* ssp. *sativa*) führt zu einer Resistenz der Pflanzen gegenüber *Botrytis cinerea* (Imani J. et al., Mol. Plant Physiol. in press). In Tomaten schützt die Expression des PCD Inhibitors p35 vor *Alternaria alternata*, *Colletotrichum coccodes* und *Pseudomonas syringae* (Lincoln J.E. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99, 15217 (2002)).

[0022] Vor diesem Hintergrund bestand im Stand der Technik ein fortdauerndes Bedürfnis nach landwirtschaftlich genutzten Pflanzen, die eine erhöhte Resistenz gegen Pathogene aufweisen. Es gibt nur wenige Ansätze, die Pflanzen eine Resistenz gegen ein breiteres Spektrum von Pathogenen, vor allem Pilzpathogene, verleihen. Die systemische erworbene Resistenz ("systemic acquired resistance"; SAR) - ein Abwehrmechanismus bei verschiedenen Pflanze/Pathogen-Interaktionen - kann durch Applikation von endogene Botenstoffe wie Jasmonat (JA) oder Salizylsäure (SA) vermittelt werden (Ward J.M. et al., Plant Cell 3, 1085 (1991); Uknes et al., Plant Cell 4(6), 645 (1992)). Ähnliche Effekte können auch durch synthetische Verbindungen wie 2,6-Dichlorisonikotinsäure (DCINA) oder Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-thiocarbonsäure-S-methylester (BTH; Bion®) (Friedrich et al., Plant J. 10(1), 61 (1996); Lawton et al., Plant J. 10, 71 (1996)) bewirkt werden. Auch die Expression der im Rahmen eines SAR hochregulierten "pathogenesis related" (PR) Proteine vermag zum Teil eine Pathogenresistenz zu bewirken.

[0023] In Gerste ist der Mlo-Locus als negativer Regulator der Pathogenabwehr beschrieben. Der Verlust oder Funktionsverlust ("loss-of-function") des Mlo-Gens bedingt eine erhöhte, rassenunspezifische Resistenz gegen zahlreiche Mehltausolate (Büschges R. et al., Cell 88, 695 1997); Jorgensen J.H., Euphytica 26, 55 (1977); Lyngkjaer M.F. et al. Plant Pathol 44, 786 (1995)).

[0024] Das Mlo-Gen ist beschrieben (Büschges R. et al., Cell 88, 695 (1997); WO 98/04586; Schulze-Lefert P. et al., Trends Plant Sci. 5, 343 (2000)). Verschiedene Mlo-Homologe aus anderen Getreidearten wurden isoliert. Verfahren unter Verwendung dieser Gene zum Erzielen einer Pathogenresistenz sind beschrieben (WO 98/04586; WO 00/01722; WO 99/47552). Nachteilig ist, dass Mlo-defiziente Pflanzen auch in Abwesenheit eines Pathogens den o.g. Abwehrmechanismus initiieren, was sich in einem spontanen Absterben von Blattzellen äußert (Wolter M. et al., Mol. Gen. Genet. 239, 122 (1993)). Dadurch erleiden mlo-resistente Pflanzen eine Ertragseinbuße von ca. 5% (Jörgensen J.H., Euphytica 63, 141 (1992)). Das spontane Absterben der Blattzellen bedingt ferner eine nachteilige Hypersuszeptibilität

gegen nekrotrophe und hemibiotrophe Pathogene wie *Magnaporthe grisea* (*M. grisea*) oder *Cochliobolus sativus* (*Bipolaris sorokiniana*) (Jarosch B. et al., *Mol Plant Microbe Interact.* 12, 508 (1999); Kumar J. et al., *Phytopathology* 91, 127 (2001)).

[0025] Apoptose, auch als programmierter Zelltod bezeichnet, ist ein essentieller Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Gewebemöostase und steht damit der Zellteilung als negativ regulierender Mechanismus gegenüber. Im vielzelligen Organismus ist die Apoptose ein natürlicher Bestandteil der Ontogenese und u.a. an der Entwicklung der Organe und der Beseitigung von gealterten, infizierten oder mutierten Zellen beteiligt. Durch die Apoptose wird eine effiziente Elimination von unerwünschten Zellen erreicht. Eine Störung oder Inhibition der Apoptose trägt zur Pathogenese verschiedener Erkrankungen bei, unter anderem zur Karzinogenese. Die Haupteffektoren der Apoptose sind Aspartat-spezifische Cystein-Proteasen, die sogenannten Caspasen. Ihre Aktivierung kann im Allgemeinen durch mindestens zwei Apoptose-Signalwege stattfinden: Zum einen durch die Aktivierung der TNF-(Tumor Necrosis Factor) Rezeptorfamilie, zum anderen spielen Mitochondrien eine zentrale Rolle. Die Aktivierung des mitochondrialen Apoptose-Signalweges wird durch Proteine der Bcl-2-Familie reguliert. Diese Proteinfamilie besteht aus anti-apoptotischen sowie pro-apoptotischen Proteinen wie z.B. Bax. Im Falle eines apoptotischen Stimulus findet eine allosterische Konformationsänderung des Bax-Proteins statt, welche zur Verankerung des Proteins in der mitochondrialen Außenmembran und seiner Oligomerisierung führt. Durch diese Oligomere werden pro-apoptotischen Moleküle aus den Mitochondrien ins Zytosol freigesetzt, die eine apoptotische Signalkaskade und letztlich die Degradierung spezifischer zellulärer Substrate bedingen, was den Zelltod zur Folge hat. Der Bax Inhibitor-1 (BI1) wurde über seine Eigenschaft isoliert, die pro-apoptotische Wirkung von BAX zu inhibieren (Xu Q. et al., *Mol Cell* 1(3), 337 (1998)). BI1 stellt ein hochkonserviertes Protein dar. Es findet sich überwiegend als integraler Bestandteil intrazellulärer Membranen. BI1 interagiert mit bcl-2 und bcl-xl. Überexpression von BI1 in Säugetierzellen unterdrückt die pro-apoptotische Wirkung von BAX, Etoposid und Staurosporin, aber nicht von Fas-Antigen (Roth W. et al., *Nat. Med.* 8, 216 (2002)). Die Inhibition von BI1 durch antisense-RNA hingegen induziert Apoptose (Xu Q. et al., *Mol Cell* 1(3), 337 (1998)). Die ersten pflanzlichen Homologen von BI1 wurden aus Reis und *Arabidopsis* isoliert (Kawai et al., *FEBS Lett* 464, 143 (1999); Sanchez et al., *Plant J.* 21, 393 (2000)). Diese pflanzlichen Proteine supprimieren BAX-induzierten Zelltod in Hefe. Die Aminosäure-Sequenzhomologie zu menschlichem BI1 beträgt ca. 45%. Das *Arabidopsis*-Homolog AtBI1 vermag in rekombinanten Pflanzen die pro-apoptotische Wirkung von BAX aus Maus zu supprimieren (Kawai-Yamada M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 (21), 12295 (2001)). Das Reis (*Oryza sativa*) BI1-Homolog OsBI1 wird in allen pflanzlichen Geweben exprimiert (Kawai et al., *FEBS Lett* 464, 143(1999)). Beschrieben sind ferner BI1-Gene aus Gerste (*Hordeum vulgare*; GenBank Acc.-No.: AJ290421), Reis (GenBank Acc.-No.: AB025926), *Arabidopsis* (GenBank Acc.-No.: AB025927), Tabak (GenBank Acc.-No.: AF390556) und Raps (GenBank Acc.-No.: AF390555, Bolduc N. et al., *Planta* 216, 377-386(2003)). Die Expression von BI1 in Gerste wird infolge einer Infektion mit Mehltau hochreguliert (Hückelhoven R. et al., *Plant Mol. Biol.* 47(6), 739 (2001)).

[0026] WO 00/26391 beschreibt die Überexpression der anti-apoptotischen Gene Ced-9 aus *C. elegans*, sflAP aus *Spodoptera frugiperda*, bcl-2 aus Mensch sowie bcl-xl aus Huhn in Pflanzen zur Erhöhung der Resistenz gegen nekrotrophe bzw. hemibiotrophe Pilze. Pflanzliche BI1 Homologe werden nicht offenbart. Die Expression erfolgt unter Kontrolle konstitutiver Promotoren. Beschrieben ist ferner die Expression eines BI1 Proteins aus *Arabidopsis* unter dem starken konstitutiven 35S CaMV Promotor in Reiszellen und eine dadurch induzierte Resistenz gegen Zelltod induzierende Substanzen aus *Magnaporthe grisea* (Matsumura H. et al., *Plant J.* 33, 425 (2003)).

[0027] Im Stand der Technik wurde ursprünglich beschrieben, dass eine konstitutive Expression eines Inhibitors der programmierten Zelltods in Pflanzen eine Resistenz gegen nekrotrophe Pilze bedingen kann.

[0028] Dem Fachmann stellte sich hier jedoch insbesondere die Aufgabe, Verfahren für die Pathogenabwehr in Pflanzen bereitzustellen, und zwar insbesondere gegen biotrophe Pathogene.

[0029] Die Aufgabe wird überraschenderweise durch das in den Hauptansprüchen definierte erfindungsgemäße Verfahren gelöst. Die Unteransprüche definieren spezielle besonders bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung.

[0030] Die Rolle von BI-1 wurde im transienten Transformationssystem in drei voneinander unabhängigen Experimenten getestet. In der Kontrolle wurden über die Versuche gemittelt 53 % der transformierten mit *P. pachyrhizi* interagierenden Zellen penetriert, während von den mit BI-1 transformierten Zellen nur 37 % penetriert wurden (FIG. 8; Tabelle FIG. 10). Drei voneinander unabhängige Experimente liegen den Werten zugrunde. Als Kontrolle wurden Gerstebblätter mit dem Reportergenkonstrukt pGY1-GFP und dem leeren Vektor transformiert. Die Penetrationsrate ist in den mit BI-1 transformierten Zellen signifikant verschieden vom WT ($P < 0.05$). Nach der Auswertung zeigen die transient mit BI-1 transformierten Zellen daher überraschenderweise eine signifikant erhöhte Penetrationsresistenz gegen *P. pachyrhizi* ($P < 0.05$; Abb. 8; Tabelle FIG. 10). Auffällig war bei der mikroskopischen Beobachtung, dass die BI-1 bildenden Zellen deutlich vitaler wirkten als Zellen die GFP oder ADF3 exprimierten.

[0031] Bereits die transiente Überexpression des Zelltodinhibitors BI-1 in Gerste ließ somit überraschenderweise die Tendenz zu einer erhöhten Resistenz der Pflanzenzellen gegenüber der Penetration durch Sojarost erkennen. Um dies zu bestätigen, wurde die Interaktion zwischen transgenen Gerstenpflanzen der Sorte 'Golden Promise' (GP), die ein

GFP-BI-1 Überexpressionskonstrukt enthalten im Vergleich zum Wildtyp (WT) der Sorte mikroskopisch untersucht. Für die Herstellung der transgenen Pflanzen wurde eine GFP-BI-1 Fusion unter der Kontrolle des konstitutiven CAMV 35S Promoters verwendet und so eine ausreichende Expression des Proteins gewährleistet.

[0032] In einem Versuch wurden Blätter des WT der Sorte ‚Golden Promise‘ und der transgenen Gerste-Linie (Sorte ‚Golden Promise‘) #6(1)E8L1(T1) mit *P. pachyrhizi* inokuliert und 24 h nach der Inokulation in Entfärbelösung fixiert. Nach der vollständigen Entfärbung wurden die Blätter mit Anilinblau gefärbt. Anilinblau lagert sich in die Struktur von Kallose ein und färbt so bevorzugt Papillen an, bei denen es zur Akkumulation und Vernetzung von Kallose mit anderen polymeren Substanzen kommt. Zellen, die durch eine hypersensitive Reaktion (HR), einen der Apoptose in Säugerzellen ähnlichen Prozess durchlaufen haben, zeigen nach Anilinblaufärbung ebenfalls eine helle Fluoreszenz. Auf den inokulierten Gerstebältern wurde die Anzahl der Sporen, die keimten Sporen mit Keimschläuchen die bereits ein Appressorium gebildet hatten und, als Zellreaktion, die Appressorien mit darunter liegenden Papillen sowie die HR gezählt. Größere Sporenzusammenballungen, bei denen eine Zuordnung der Appressorien zu den Sporen nicht mehr möglich war, wurden nicht mitgezählt. Es wurden, soweit möglich, pro Blatt mindestens 100 Sporen mit Appressorien ausgezählt. Schon in diesem Versuch konnte in der transgenen Linie eine signifikant gesteigerte Papillenbildung und eine signifikant verminderte HR der Zellen beobachtet werden ($P < 0.01$; Tabelle FIG. 11 A/B, FIG. 12).

[0033] Sowohl Bgh (Hückelhoven R., FEMS Microbiol. Letters 245, 9 (2005)) als auch *P. pachyrhizi* (Koch E. et al., Phytopath. Z. 106, 302 (1983)) sind biotrophe Pathogene. Eine HR der befallenen Zellen kann daher die Entwicklung der Pilze stoppen, da sie ihnen die Nahrungsgrundlage entzieht. Wird die HR unterbunden, können die Zellen gegenüber einer Infektion durch biotrophe Pathogene empfindlicher werden. Trotzdem zeigen transient, mit einem BI-1 Überexpressionskonstrukt transformierte Gerstезellen überraschenderweise eine erhöhte Resistenz gegen die Penetration durch *P. pachyrhizi*. Dies überrascht, da eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem biotrophen Pilz zu erwarten wäre. Allerdings ist die HR bei der Resistenz von Gerste und Weizen gegen das inkompatible Pathogen *P. pachyrhizi* nicht die einzige und möglicherweise nicht die entscheidende Resistenzreaktion. So wird *P. pachyrhizi* in Weizen durch die Bildung von Papillen abgewehrt (Hoppe H.H. et al., Pro. Intern. Congress of SABRAO (Bangkok 1985) 1986). Gerste reagiert, abhängig von der Sorte, mit Papillenbildung und HR der infizierten Zellen. Gerste mit dem *mlo5* Allel reagiert zudem mit einer gesteigerten Papillenbildung. Bgt wird von Gerste auch durch Papillenbildung, aber vor allem durch eine HR infizierter Zellen abgewehrt (Hückelhoven R. et al., Mol. Plant Pathol. 2, 199 (2001)). Im Gegensatz zu *P. pachyrhizi* führt aber die transiente Überexpression von BI-1 in Gerste zu einer erhöhten Penetrationsrate der Zellen durch Bgt (Eichmann R. et al., Mol. Plant Microbe Interact. 17, 484 (2004)). Ebenso zeigen Gerstenpflanzen mit dem *mlo5* Allel, das eine breite Resistenz gegen Bgh vermittelt, bei transienter Überexpression von BI-1 eine größere Empfindlichkeit der Zellen gegenüber einer Penetration durch Bgh (Hückelhoven R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 29, 5555 (2003)). Obwohl die Resistenz von Gerste mit dem *mlo5* Allel nicht auf einer HR der infizierten Zellen sondern auf einer effizienteren Akkumulation von antimikrobiellen Verbindungen, H_2O_2 und einer gesteigerten Papillenbildung beruht, scheint die Inhibition der HR auch die anderen Resistenzreaktionen zu beeinflussen (Hückelhoven R. et al., Plant Physiol. 119, 1251 (1999)). Ohne durch Theorie eine Einschränkung herbeizuführen, diese Beobachtungen einer verringerten Penetrationsresistenz durch die Inhibition der HR deutet auf eine vernetzte Regulation der Resistenzreaktionen hin. Die Vermutung der vernetzten Regulation von Resistenzreaktionen wird durch die mikroskopische Analyse transgener mit *P. pachyrhizi* inokulierter Gerstepflanzen unterstützt. Diese tragen ein BI-1 Überexpressionskonstrukt und reagieren auf die Infektion mit einer gesteigerten Papillenbildung. Auf den Blättern der transgenen Pflanzen zeigten nur 16 - 26 % der infizierten Zellen eine HR, dagegen war bei ca. 50 % der befallenen Zellen auf den WT-Blättern eine HR zu sehen. In der Gerstensorte ‚Golden Promise‘ scheint daher die HR der Zellen auch ein wichtiger Resistenzmechanismus gegen den biotrophen *P. pachyrhizi* zu sein, obwohl *P. pachyrhizi* zumindest in Soja die Epidermiszellen nicht zu seiner Ernährung heranzieht sondern erst im Mesophyll Haustorien bildet (Koch E. et al., Phytopath. Z. 106, 302 (1983)). Dieses Stadium erreicht der Pilz aber auf der Nicht-Wirtspflanze Gerste im Allgemeinen nicht. Die Inhibition der HR ermöglicht Bgt die Penetration der Zellen und es gelingt dem Pilz sich erfolgreich zu etablieren (Eichmann R. et al., Mol. Plant Microbe Interact. 17, 484 (2004)). Für diesen Prozess scheinen weitere pilzspezifische Faktoren notwendig zu sein. Anscheinend können diese speziellen Faktoren des Bgt entweder die alternative Resistenzantwort der Pflanzenzelle oder die Erkennung durch diese supprimieren. Diese Faktoren fehlen *P. pachyrhizi* wahrscheinlich. So kann die Pflanzenzelle *P. pachyrhizi* möglicherweise erkennen und, da BI-1 die HR unterdrückt, eine alternative Resistenzantwort, die Papillenbildung, induzieren. Eine Erkennung von *P. pachyrhizi* durch die Pflanze wird durch die Beobachtung der gesteigerten Papillenbildung in Gerste mit dem *mlo5* Allel unterstützt. Warum aber die Pflanze das Pathogen *P. pachyrhizi*, das auf Wirtspflanzen einer völlig anderen Ordnung spezialisiert ist, erkennen kann bleibt offen (Sinclair J. B. et al. (eds.), Proceedings of the soybean rust workshop (1995), National Soybean Research Laboratory, Publication No. 1 (1996)). Das ‚Erkennungsmerkmal‘ von *P. pachyrhizi* könnte ein unspezifischer Elicitor („pathogenesis-associated molecular patterns“ PAMP) wie das INF1 aus *P. infestans* sein, das in *Nicotiana sp.* eine HR auslöst (Kamoun S. et al., Plant Cell 10, 1413 (1998)). PAMPs werden von der Pflanze als Fremdmoleküle erkannt und lösen eine Resistenzreaktion aus. Nicht alle Blätter der transgenen Pflanzen zeigten die gesteigerte Papillenbildung, obwohl das BI-1 Genkonstrukt in ihnen mittels PCR nachgewiesen werden konnte. Dies könnte die Folge eines ungünstigen Insertionsortes des Kon-

struktus sein, der eine effektive Expression des BI-1 verhindert und/oder zu antagonistischen Effekten durch andere Gene führt. Da der Nachweis auf DNA-Ebene erfolgte, kann keine Aussage über die Expression des BI-1 gemacht werden. Zu beachten ist auch, dass schon kleine Beschädigungen der Samen oder der Blätter die Entwicklung der Pflanze entscheidend beeinflussen oder verhindern können. So sind einige Samen der Linie #6(2)E15L7P2 (T2) nicht

5

gekeimt.
[0034] Ein Gegenstand der Erfindung betrifft daher ein Verfahren zum Erzeugen oder Erhöhen einer Resistenz in einer Sojapflanze, oder einem Teil einer Sojapflanze, gegen mindestens einen biotrophen Pilz aus dem Genus *Phakopsora*. Das Verfahren umfasst einen Schritt, in dem die Menge eines Bax Inhibitor-1 (BI1) Proteins oder dessen Funktion in der Sojapflanze oder zumindest einem Teil einer Sojapflanze erhöht wird. Unter einem Teil einer Pflanze ist die ganze Pflanze, ein oder mehrere Organe von ihr, ein Gewebe oder mindestens eine Zelle gemeint. Das Verfahren umfasst ferner den Schritt, dass eine Pflanze oder ein Teil einer Pflanze, in welchem/ welcher das BI1 Protein oder dessen Funktion erhöht wurde, dahingehend ausgewählt wird, dass er/sie eine erhöhte Resistenz gegen mindestens einen biotrophen Pilz aus dem Genus *Phakopsora* im Vergleich zu einer Ausgangspflanze aufweist, bei dem/der die Erhöhung der Menge oder Funktion des BI1 Proteins gegenüber einer Ausgangspflanze oder deren Teil erhöht ist.

10

15

[0035] Gemäß der vorliegenden Erfindung ist der biotrophe Pilz ausgewählt aus der Gattung *Phakopsora*. In besonders bevorzugten Ausführungsformen ist das Pathogen *Phakopsora pachyrhizi* und/oder *P. meibomia* (gemeinsam auch als "Sojabohnenrost" oder "Sojarost" bezeichnet), wobei der erstere am meisten bevorzugt ist.

[0036] Der Schritt der Erhöhung der Menge oder Funktion des BI1 Proteins wird durch biotechnologische Verfahren erzielt. "Biotechnologische" Verfahren umfasst unter anderem die rekombinante Expression des Proteins in einer Zelle, vorzugsweise funktionell verknüpft mit und angetrieben durch einen heterologen Promotor. Die genannte Erhöhung kann aber auch beispielsweise durch Austausch nur des endogenen Promotors oder bspw. Silencing von Faktoren, die die Expression des endogenen BI1 Proteins im allgemeinen hemmen, erreicht werden. Dementsprechend umfasst der Begriff der biotechnologischen Verfahren alle der modernen Molekularbiologie offenstehenden Verfahren, insbesondere die der rekombinanten Gentechnologie, die dem Fachmann bekannt sind, und auf die im Laufe der Beschreibung noch eingehender eingegangen werden wird.

20

25

[0037] Die Pflanze ist aus den Leguminosen ausgewählt, umfassend Sojabohne (*Glycine max* (L.) Merrill).

[0038] In jeder der hierin offenbarten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ist es besonders bevorzugt, dass die Menge oder Funktion des BI1 Proteins zumindest in der Epidermis erhöht wird, vorzugsweise im wesentlichen gewebespezifisch in der Epidermis; insbesondere bevorzugt ist es, dass die Menge oder Funktion des BI1 Proteins spezifisch in der Epidermis erhöht wird und/oder im Mesophyll im wesentlichen nicht erhöht wird.

30

[0039] Unter der Epidermis versteht der Fachmann das vorherrschende Abschlussgewebe primärer oberirdischer Pflanzenteile, so des Sprosses, der Blätter, Blüten, Früchte und Samen. Nach außen scheidet die Epidermiszellen eine wasserabstoßende Schicht, die Kutikula ab. Die Wurzeln sind von der Rhizodermis umgeben, welche der Epidermis in vieler Hinsicht ähnelt, jedoch auch markante Unterschiede zu ihr aufweist. Die Epidermis entsteht aus der äußersten Schicht des Apikalmeristems. Die Ableitung der Rhizodermis hingegen ist weniger klar. Je nach Art kann sie entwicklungs geschichtlich entweder der Wurzelhaube oder der primären Rinde zugerechnet werden. Der Epidermis können zahlreiche Funktionen zugeschrieben werden: Sie bietet der Pflanze Schutz vor Austrocknung und regelt die Transpirationsrate. Sie schützt die Pflanze vor den verschiedensten chemischen und physikalischen Fremdeinflüssen sowie vor Tierfraß und Befall durch Parasiten. Sie ist am Gasaustausch, an der Sekretion bestimmter Stoffwechselprodukte und an der Absorption von Wasser beteiligt. In ihr sind Rezeptoren für Licht und mechanische Reize enthalten. Sie wirkt damit als ein Signalwandler zwischen Umwelt und Pflanze. Entsprechend den verschiedenen Funktionen enthält die Epidermis eine Anzahl unterschiedlich differenzierter Zellen. Hinzu kommen artspezifische Varianten und unterschiedliche Organisation der Epidermen in den einzelnen Teilen einer Pflanze. Im wesentlichen besteht sie aus drei Kategorien von Zellen: den "eigentlichen" Epidermiszellen, den Zellen der Stomata (Spaltöffnungen) und den Trichomen (griech.: Trichoma, Haar), epidermalen Anhangsgebilden verschiedener Form, Struktur und Funktion.

35

40

45

[0040] Die "eigentlichen", d.h., die am wenigsten spezialisierten Epidermiszellen machen die Hauptmasse der Zellen des Abschlussgewebes aus. Sie sind in der Aufsicht entweder polygonal (von platten- oder tafelförmiger Gestalt) oder gestreckt. Die zwischen ihnen ausgebildeten Wände sind vielfach gewellt oder gebuchtet. Wodurch diese Form während der Entwicklung induziert wird, ist unbekannt, die vorliegenden Hypothesen erklären den Sachverhalt nur unbefriedigend. Gestreckte Epidermiszellen findet man an Organen oder Organteilen, die selbst gestreckt sind, so z.B. an Stengeln, Blattstielen und Blattrippen sowie an den Blättern der meisten Monokotyledonen. Ober- und Unterseite von Blattspreiten können von unterschiedlich strukturierten Epidermen bedeckt sein wobei sowohl die Form der Zellen, die Dicke der Wände als auch die Verteilung und Zahl spezialisierter Zellen (Stomata und/oder Trichome) pro Flächeneinheit variieren kann. Große Variationen findet man auch innerhalb einzelner Familien, z. B. bei den Crassulaceen. Meist ist die Epidermis einschichtig, jedoch sind bei Arten aus mehreren Familien (Moraceae: hier die meisten Ficus-Arten, Piperaceae: Peperonia [Peperonie], Begoniaceae, Malvaceae u.a.) mehrschichtige wasserspeichernde Epidermen nachgewiesen worden. Epidermiszellen sondern nach außen eine Cutinschicht (Kutikula) ab, die als ein im wesentlichen ununterbrochener Film im wesentlichen alle epidermalen Oberflächen überzieht. Sie kann entweder glatt oder durch Vorwölbungen, Leisten,

50

55

Falten und Furchen strukturiert sein. Doch nicht immer beruht eine durch Betrachtung der Oberfläche sichtbare Faltung der Kutikula auf der Ausbildung von Kutikularleisten. Es gibt durchaus Fälle, wo eine Kutikulafaltung nur der Ausdruck der darunterliegenden Ausstülpungen der Zellwand ist. Epidermale Anhangsgebilde verschiedener Form, Struktur und Funktion werden als Trichome bezeichnet und hierin ebenfalls unter dem Begriff "Epidermis" verstanden.. Sie treten als Schutz-, Stütz- und Drüsenhaare in Form von Schuppen, verschiedenen Papillen und bei Wurzeln als absorbierende Haare auf. An ihrer Bildung sind allein Epidermiszellen beteiligt. Oft entsteht ein Trichom aus nur einer solchen Zelle, manchmal sind an der Entstehung mehrere beteiligt.

[0041] Ebenfalls umfasst unter dem Begriff "Epidermis" sind Papillen. Papillen sind Ausstülpungen der Epidermisoberfläche. Das Lehrbuchbeispiel hierfür sind die Papillen auf Blütenoberflächen des Stiefmütterchens (*Viola tricolor*) sowie die Blattoberflächen vieler Arten im tropischen Regenwald. Sie verleihen der Oberfläche eine samtartige Konsistenz. Einige Zellen von Epidermen können als Wasserspeicher ausgebildet sein. Ein typisches Beispiel stellen die Blasen Zellen an Oberflächen vieler Mittagsblumenarten und anderer Sukkulenten dar. Bei manchen Pflanzen, z.B. bei der Glockenblume (*Campanula persicifolia*) sind die Außenwände der Epidermis linsenförmig verdickt.

[0042] Die Hauptmasse aller Gewebe bildet das Grundgewebe oder Parenchym. Zu den parenchymatischen Geweben gehört das Mesophyll, das in Blättern in Palisadenparenchym und Schwammparenchym differenziert sein kann.

[0043] Folglich versteht der Fachmann unter Mesophyll ein parenchymatisches Gewebe. Parenchymatische Zellen sind durchweg lebend, meist isodiametrisch, seltener gestreckt. Das Mark der Sprosse, die Speichergewebe der Früchte, Samen, der Wurzel und anderer unterirdischer Organe sind ebenso als Parenchyme zu betrachten wie das Mesophyll.

[0044] Das Mesophyll ist in den Blättern der meisten Farne und Phanerogamen, besonders ausgeprägt bei den Dikotyledonen und vielen Monokotyledonen, in Palisaden- und Schwammparenchym untergliedert. Ein "typisches" Blatt ist dorsiventral gebaut. Das Palisadenparenchym liegt dabei meist an der Blattoberseite unmittelbar unter der Epidermis. Das Schwammparenchym füllt den darunterliegenden Raum aus. Es ist von einem voluminösen Interzellulärsystem durchsetzt, dessen Gasraum über die Spaltöffnungen in direktem Kontakt zur Außenwelt steht.

[0045] Das Palisadenparenchym besteht aus langgestreckten, zylindrischen Zellen. Bei einigen Arten sind die Zellen irregulär, gelegentlich sind sie gegabelt (Y-förmig: Armpalisadenparenchym). Solche Varianten kommen bei Farnen, Coniferen und einigen wenigen Angiospermen (z.B. bei einigen Ranunculaceen- und Caprifoliaceenarten [Beispiel: Holunder]) vor. Neben der eben beschriebenen, am weitesten verbreiteten Organisationsform sind die folgenden Varianten nachgewiesen worden:

- Palisadenparenchym an der Blattunterseite. Besonders auffällig bei Schuppenblättern. Beispiel: Lebensbaum (*Thuja*), sowie bei den Blättern des Bärlauchs (*Allium ursinum*).
- Palisadenparenchym an beiden Blattseiten (Ober- und Unterseite). Häufig bei Pflanzen trockener Standorte (Xerophyten). Beispiel: Kompasspflanze (*Lactuca serriola*);
- Ringförmig geschlossenes Palisadenparenchym: In zylindrisch organisierten Blättern und in Nadeln der Koniferen.

[0046] Die Variabilität der Schwammparenchymzellen und die Ausbildung des Schwammparenchyms selbst sind noch vielgestaltiger als die des Palisadenparenchyms. Es wird meist als Durchlüftungsgewebe bezeichnet, denn es enthält eine Vielzahl untereinander verbundener Interzellularen.

[0047] Das Mesophyll kann das so genannte Assimilationsgewebe umfassen, jedoch sind die Begriffe Mesophyll und Assimilationsgewebe nicht als Synonyme zu verwenden. Es gibt chloroplastenfreie Blätter, die sich in ihrem Aufbau nur unwesentlich von vergleichbaren, grünen Blättern unterscheiden. Folglich enthalten sie Mesophyll, doch eine Assimilation unterbleibt; umgekehrt findet eine Assimilation z.B. auch in Sproßabschnitten statt.

[0048] In der vorliegenden Beschreibung wird die Epidermis vorzugsweise biochemisch charakterisiert. Die Epidermis kann in einer bevorzugten Ausführungsform durch die Aktivität eines oder mehrerer der folgenden Promotoren gekennzeichnet werden:

- WIR5 (=GstA1), acc. X56012; Dudler & Schweizer,
- GLP4, acc. AJ310534; Wei Y., Zhang Z., Andersen C.H., Schmelzer E., Gregersen P.L., Collinge D.B., Smedegaard-Petersen V. und Thordal-Christensen H., *Plant Molecular Biology* 36, 101 (1998),
- GLP2a, acc. AJ237942, Schweizer P., Christoffel A. und Dudler R., *Plant J.* 20, 541 (1999);
- Prx7, acc. AJ003141, Kristensen B.K., Ammitzböll H., Rasmussen S.K. and Nielsen K.A., *Molecular Plant Pathology*, 2(6), 311 (2001);
- GerA, acc. AF250933 ; Wu S., Druka A., Horvath H., Kleinhofs A., Kannangara G. and von Wettstein D., *Plant Phys Biochem* 38, 685 (2000);
- OsROC1, acc. AP004656
- RTBV, acc. AAV62708, AAV62707 ; Klöti A., Henrich C., Bieri S., He X., Chen G., Burkhardt P.K., Wünn J., Lucca P., Hohn T., Potrykus I. und Fütterer J., *PMB* 40, 249 (1999);
- Chitinase ChtC2-Promotor aus Kartoffel (Ancillo et al., *Planta*. 217(4), 566 (2003));

EP 2 081 954 B1

- AtProT3 Promotor (Grallath et al., Plant Physiology. 137(1), 117 (2005))
- SHN-Promotoren aus Arabidopsis (AP2/EREBP transcription factors involved in cutin and wax production) (Aarón et al., Plant Cell. 16(9), 2463 (2004));
- GSTA1 aus Weizen (Dudler et al., WP2005306368 bzw. Altpeter et al., Plant Molecular Biology. 57(2),271 (2005)).

5

[0049] In der vorliegenden Beschreibung wird die Epidermis dadurch gekennzeichnet, dass alle genannten Promoter in dem Gewebe oder der Zelle aktiv sind. In der vorliegenden Beschreibung wird die Epidermis dadurch gekennzeichnet, dass nur ein Teil der Promotoren aktiv ist, z.B. bevorzugt 2, 3, 5 oder am meisten bevorzugt 7 oder mehr, mindestens jedoch einer der oben aufgezählten.

10 **[0050]** In der vorliegenden Beschreibung wird das Mesophyll biochemisch charakterisiert. Das Mesophyll kann durch die Aktivität eines oder mehrerer der folgenden Promotoren gekennzeichnet werden:

- PPCZm1 (=PEPC); Kausch A.P., Owen T.P., Zachwieja S.J., Flynn A.R. und Sheen J., Plant Mol. Biol. 45, 1 (2001);
- OsrbcS, Kyozyuka et al., Plant Phys 102, 991 (1993); Kyozyuka J., McElroy D., Hayakawa T., Xie Y., Wu R. und Shimamoto K., Plant Phys. 102, 991 (1993);
- 15 - OsPPDK, acc. AC099041;
- TaGF-2.8, acc. M63223; Schweizer P., Christoffel A. and Dudler R., Plant J. 20, 541 (1999);
- TaFBPase, acc. X53957;
- TaWIS1, acc. AF467542; US 200220115849;
- 20 - HvBIS1, acc. AF467539; US 200220115849;
- ZmMIS1, acc. AF467514; US 200220115849;
- HvPR1a, acc. X74939; Bryngelsson et al., Mol. Plant Microbe Interact. 7(2), 267 (1994);
- HvPR1b, acc. X74940; Bryngelsson et al., Mol. Plant Microbe Interact, 7(2), 267 (1994);
- HvB1,3gluc; acc. AF479647;
- 25 - HvPrx8, acc. AJ276227; Kristensen et al., Molecular Plant Pathology, 2(6), 311 (2001);
- HvPAL, acc. X97313; Wei Y., Zhang Z., Andersen C.H., Schmelzer E., Gregersen P.L., Collinge D.B., Smedegaard-Petersen V. und Thordal-Christensen H. Plant Molecular Biology 36, 101 (1998).

30 **[0051]** In der vorliegenden Beschreibung wird das Mesophyll dadurch gekennzeichnet, dass alle genannten Promotoren in dem Gewebe oder der Zelle aktiv sind. In einer anderen Ausführungsform wird das Mesophyll dadurch gekennzeichnet, dass nur ein Teil der Promotoren aktiv ist, z.B. bevorzugt 2, 3, 5 oder besonders bevorzugt 7 oder mehr, mindestens jedoch einer der oben aufgezählten.

35 **[0052]** In der vorliegenden Beschreibung sind in einer verwendeten oder hergestellten Pflanze oder in einer erfindungsgemäßen Pflanze in der Epidermis und im Mesophyll alle genannten Promotoren aktiv. In der vorliegenden Beschreibung sind nur ein Teil der genannten Promotoren aktiv, z.B. bevorzugt 2, 5, oder insbesondere bevorzugt 7 oder mehr, mindestens ist jedoch einer der oben aufgezählten Promotoren jeweils aktiv.

40 **[0053]** In bevorzugten Ausführungsformen erfolgt die Erhöhung der Proteinmenge oder -funktion des BI1-Proteins konstitutiv oder gewebespezifisch. In besonders bevorzugten Ausführungsformen erfolgt eine im wesentlichen gewebespezifische Erhöhung der Proteinmenge oder -funktion im wesentlichen epidermisspezifisch, beispielsweise durch rekombinante Expression einer für das BI1-Protein kodierenden Nukleinsäuresequenz unter Kontrolle eines Epidermisspezifischen Promotors. Insbesondere bevorzugt erfolgt die Erhöhung der Expression oder Funktion des BI1 Proteins in der Epidermis, wobei aber die Expression des BI-1 Proteins im Mesophyll im wesentlichen unverändert bleibt, oder sie wird vermindert, und wobei andere Gewebe außer Betracht bleiben.

45 **[0054]** In einer Ausführungsform wird wie hierin beschrieben, die Expression oder Funktion des hierin charakterisierten BI-1 zumindest in der Epidermis einer Pflanze erhöht. Eine Erhöhung der Expression kann wie unten beschrieben erreicht werden. Unter Erhöhung der Expression oder Funktion wird hierin sowohl die Aktivierung oder Steigerung der Expression oder Funktion des endogenen Proteins einschließlich einer de novo Expression als auch eine Erhöhung oder Steigerung durch die Expression eines transgenen Proteins oder Faktors verstanden.

50 **[0055]** In einer besonders bevorzugten Ausführungsform kann die Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion mindestens eines pflanzlichen BI1-Proteins kombiniert werden mit einem mloresistenten Phänotyp oder mit der Inhibierung oder Reduzierung im Vergleich zu einer Kontrollpflanze der Expression von MLO, RacB und/oder NaOx in der Pflanze oder einem Teil davon, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen und/oder mit der Erhöhung der Expression oder Funktion von PEN2 und/oder PEN1 in der Pflanze, z.B. konstitutiv, oder einem Teil davon, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen wird, mit der Maßgabe, dass die Expression eines pflanzlichen BI1-Proteins in der Blattepidermis im wesentlichen unverändert bleibt oder reduziert wird.

55 **[0056]** In Gerste ist der Mlo-Locus als negativer Regulator der Pathogenabwehr beschrieben. Der Verlust oder Funktionsverlust ("loss-of-function") des Mlo-Gens bedingt eine erhöhte, rassenunspezifische Resistenz gegen zahlreiche

Mehltauisolate (Büschges R. et al., Cell 88, 695 (1997); Jorgensen J.H., Euphytica 26, 55 (1977); Lyngkjaer M.F. et al., Plant Pathol. 44, 786 (1995)). Ein mlo-resistenter Phänotyp kann wie im Stand der Technik beschrieben erreicht werden. Verfahren unter Verwendung dieser Gene zum Erzielen einer Pathogenresistenz sind beschrieben u.a. in WO 98/04586; WO 00/01722; WO 99/47552.

5 **[0057]** Vorteilhaft kann in einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung die Aktivität, Expression oder Funktion von MLO, RacB und/oder NaOx in der Pflanze oder einem Teil davon, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen inhibiert oder im Vergleich zu einer Kontrollpflanze oder einem Teil davon reduziert werden. Durch die Reduzierung der Aktivität oder Funktion von MLO, RacB und/oder NaOx in der Pflanze oder einem Teil davon, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch
10 mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen wird vorzugsweise die Resistenz oder Widerstandskraft gegen biotrophe Pathogene bei erfindungsgemäß hergestellten Pflanzen erhöht. Die Aktivität oder Funktion von MLO, RacB und/oder NaOx kann analog wie für MLO in WO 98/04586; WO 00/01722; WO 99/47552 und den weiteren unten genannten Schriften beschrieben reduziert oder inhibiert werden, deren Inhalt hiermit ausdrücklich als mit aufgenommen gilt, insbesondere um die Aktivität und Inhibierung von MLO zu beschreiben. Die Beschreibung
15 der genannten Schriften beschreibt Verfahren Methoden und besonders bevorzugte Ausführungsformen zur Erniedrigung oder Inhibierung der Aktivität oder Funktion von MLO, die Beispiele geben konkret an, wie dies ausgeführt werden kann.

[0058] Die Reduzierung der Aktivität oder Funktion, ggf. der Expression von RacB ist in der WO 2003/20939 ausführlich beschrieben, die hiermit ausdrücklich mit als in die vorliegende Beschreibung mit aufgenommen gilt.

20 **[0059]** Die Beschreibung der genannten Schrift beschreibt Verfahren und Methoden zur Erniedrigung oder Inhibierung der Aktivität oder Funktion von Proteinen, die Beispiele geben konkret an, wie dies ausgeführt werden kann. Besonders bevorzugt wird die Reduktion oder Inhibierung der Aktivität oder Funktion von RacB gemäß den in der WO 2003/20939 besonders bevorzugten Ausführungsformen und den Beispielen und in den dort als besonders bevorzugt dargestellten Organismen durchgeführt, insbesondere in einer Pflanze oder einem Teil davon, z.B. in einem Gewebe, besonders
25 vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen. Die Reduzierung der Aktivität oder Funktion, ggf. der Expression von RacB ist in der WO 2003/20939 ausführlich beschrieben. Der Fachmann findet in der WO 2003/20939 die Sequenzen, die für RacB Proteine codieren und kann mit dem in der WO 2003/20939 zur Verfügung gestellten Verfahren auch RacB identifizieren.

[0060] Die Reduzierung der Aktivität oder Funktion, ggf. der Expression von NaOx ist in WO 2004/09820 (= PCT/EP/03/07589) ausführlich beschrieben, die hiermit ausdrücklich mit als in die vorliegende Beschreibung mit aufgenommen gilt. Die Beschreibung der genannten Schrift beschreibt Verfahren und Methoden zur Erniedrigung oder Inhibierung der Aktivität oder Funktion von NaOx, die Beispiele geben konkret an, wie dies ausgeführt werden kann. Besonders bevorzugt wird die Reduktion oder Inhibierung der Aktivität oder Funktion von NaOx gemäß den in WO 2004/09820 (= PCT/EP/03/07589) besonders bevorzugten Ausführungsformen und den Beispielen und in den dort als besonders bevorzugt
35 dargestellten Organismen durchgeführt insbesondere in einer Pflanze oder einem Teil davon, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen. Der Fachmann findet in WO 2004/09820 (= PCT/EP/03/07589) die Sequenzen, die für NaOx Proteine codieren und kann mit dem in WO 2004/09820 (= PCT/EP/03/07589) zur Verfügung gestellten Verfahren auch NaOx identifizieren.

[0061] Vorteilhaft kann in einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung die Aktivität, Expression oder Funktion von PEN1, PEN2 und/oder SNAP34 in der Pflanze, z.B. konstitutiv, oder einem Teil davon, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen erhöht werden. Die Erhöhung der Aktivität, die auch eine de novo Expression umschließt, von PEN1, PEN2 und/oder SNAP
40 34 in der Pflanze, z.B. konstitutiv, oder einem Teil davon, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen wird vorzugsweise die Resistenz oder Widerstandskraft gegen biotrophe Pathogene bei erfindungsgemäß hergestellten Pflanzen erhöhen. Die Erhöhung der Aktivität oder Funktion, ggf. der Expression von PEN2 ist in der WO03/074688 ausführlich beschrieben und die hiermit ausdrücklich als in der vorliegenden Beschreibung mit aufgenommen gilt. Die Beschreibung der genannten Schrift beschreibt Verfahren und Methoden zur Erniedrigung oder Inhibierung der Aktivität oder Funktion von PEN2, die Beispiele geben konkret an, wie dies ausgeführt werden kann. Besonders bevorzugt wird die Reduktion oder Inhibierung der Aktivität
45 oder Funktion von PEN2 gemäß den in der WO03/074688 besonders bevorzugten Ausführungsformen und den Beispielen und in den dort als besonders bevorzugt dargestellten Organismen durchgeführt, insbesondere in Pflanzen, z.B. konstitutiv, oder einem Teil davon, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen. Der Fachmann findet in der WO03074688 die Sequenzen, die für PEN2 Proteine codieren und kann mit dem in der WO03/074688 zur Verfügung gestellten Verfahren auch PEN2 identifizieren.
50

[0062] Die Expression von PEN1 und SNAP34 kann analog zu den in der WO03/074688 beschriebenen Verfahren erhöht werden. Der Fachmann kann aufgrund des allgemeinen Fachwissens und des ihm bekannten Stands der Technik PEN1 und SNAP34-Nukleinsäuresequenzen und - Proteinsequenzen isolieren und überexprimieren. SEQ ID NO. 39

beschreibt die Nukleinsäuresequenz, die für PEN1 aus Gerste kodiert, die Proteinsequenz ist in SEQ ID No.: 40 beschrieben. SEQ ID NO.: 41 beschreibt die Nukleinsäuresequenz, die für PEN1 1 aus Arabidopsis thaliana kodiert, die Proteinsequenz ist in SEQ ID No. 42 beschrieben. PEN1 aus Arabidopsis thaliana ist veröffentlicht unter den accession numbers N M 202559 und N M 112015. Das Homolog aus Gerste wird als ROR2 offenbart in accession numbers AY246907 und AY246906. Es handelt sich um Mitglieder der recht großen Syntaxin-Proteinfamilie. Der Fachmann kann somit durch einfache Homologievergleiche weitere Syntaxin-Proteine identifizieren, die als potentielle Resistenzgene in dem erfindungsgemäßen Verfahren exprimiert werden.

[0063] SEQ ID NO. 43 beschreibt die Nukleinsäuresequenz, die für SNAP34 aus Gerste kodiert, die Proteinsequenz ist in SEQ ID No.: 44 beschrieben. Das SNAP-34 Homolog aus Gerste ist auch veröffentlicht unter AY 247208 (SNAP-34). Homologe unbekannter Funktion, die eine Rolle in der Resistenz spielen könnten, sind veröffentlicht unter AY 247209 (SNAP-28) und AY 247210 (SNAP-25). Folgende Arabidopsis-Gene zeigen eine höhere Homologie zu Gerste SNAP34 als Gersten SNAP-28 bzw. SNAP-25 zu SNAP-34 und können somit als potentielle Resistenzvermittelnde Gene vorteilhaft coüberexprimiert werden:

AAM 62553 - Arabidopsis SNAP25a
 NP 200929 - Arabidopsis SNAP33b
 NP 172842 - Arabidopsis SNAP30
 NP 196405 - Arabidopsis SNAP29

[0064] Folglich betrifft die Beschreibung auch eine Pflanze, in der mindestens weiterhin in der Epidermis ein Polypeptid überexprimiert wird, das codiert wird von einem Nukleinsäuremolekül, das die in Seq. ID No. 39, 41 oder 43 oder eine der in den genannten Datenbankveröffentlichungen gezeigten Sequenzen umfasst oder das die in Seq. ID No. 40, 42 oder 44 gezeigte oder eine der in den genannten Datenbankveröffentlichungen gezeigten Aminosäuresequenzen umfasst, oder das ein funktionelles Äquivalent davon ist oder das eine Homologie von mindestens 50 %, bevorzugt 70 %, mehr bevorzugt 80 %, noch mehr bevorzugt 90 %, 95 % oder mehr zu den genannten Sequenzen auf Ebene des codierenden Nukleinsäuremoleküls oder bevorzugt auf A-minosäureebene hat, oder eine Pflanze, in der konstitutiv oder in einem Teil, z.B. in einem Gewebe, besonders vorteilhaft jedoch mindestens in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen das vorhergehend charakterisierte Polypeptide aktiviert wird oder dessen Aktivität oder Funktion erhöht wird.

[0065] Eine Reduktion oder Expression oder Aktivität eines Proteins kann durch einen Fachmann geläufige Verfahren bewirkt werden, z.B. Mutagenese, z.B. EMS, ggf. Tilling, iRNA; Ribozyme, Silencing, Knockout, etc. Verfahren zur Reduzierung sind insbesondere beschrieben in WO 2003/20939, dessen Methoden an die hierin beschriebenen Sequenzen leicht angepasst werden können. Daher wird der Inhalt der WO 2003/20939 explizit hierin mit aufgenommen.

[0066] Die Reduzierung oder Verminderung der Expression eines Proteins, der Aktivität oder der Funktion kann auf vielfältige Art und Weise realisiert werden.

[0067] "Reduzierung", "reduzieren", "Verminderung" oder "vermindern" ist weit auszulegen und umfasst die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität eines Proteins.

[0068] Eine Verminderung umfasst auch eine mengenmäßige Verringerung eines Proteins bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen des Proteins (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von Aktivität bzw. Funktion oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit des Proteins). Dabei wird die Expression eines bestimmten Proteins oder die Aktivität bzw. Funktion in einer Zelle oder einem Organismus bevorzugt um mehr als 50 %, besonders bevorzugt um mehr als 80 %, ganz besonders bevorzugt um mehr als 90 % vermindert.

[0069] Die Methoden der dsRNAi, der Kosuppression mittels sense-RNA und der "VIGS" ("virus induced gene silencing") werden auch als "post-transcriptional gene silencing" (PTGS) bezeichnet. PTGS-Verfahren wie auch die Verminderung der Funktion oder Aktivität mit dominant-negativen Varianten sind besonders vorteilhaft, weil die Anforderungen an die Homologie zwischen dem zu supprimierenden endogenem Gen und der transgen exprimierten sense- oder dsRNA-Nukleinsäuresequenz (bzw. zwischen dem endogenen Gen und seiner dominant-negativen Variante) geringer sind als beispielsweise bei einem klassischen antisense-Ansatz. Entsprechende Homologie-Kriterien sind bei der Beschreibung des dsRNAI-Verfahrens genannt und allgemein für PTGS-Verfahren oder dominant-negative Ansätze übertragbar.

[0070] "Einbringung" umfasst alle Verfahren, die dazu geeignet eine Verbindung, direkt oder indirekt, in der Epidermis oder einem wesentlichen Teil der Epidermiszellen, Kompartiment oder Gewebe derselben einzuführen oder dort zu generieren. Direkte und indirekte Verfahren sind umfasst. Die Einbringung kann zu einer vorübergehenden (transienten) Präsenz einer Verbindung (beispielsweise einer dsRNA) führen oder aber auch zu einer dauerhaften (stabilen). Einführen umfasst beispielsweise Verfahren wie Transfektion, Transduktion oder Transformation.

[0071] In Expressionskonstrukten steht ein hierin offenbartes Nukleinsäuremolekül, dessen Expression (Transkription und ggf. Translation) ein entsprechendes Aminosäuremolekül generiert, bevorzugt in funktioneller Verknüpfung mit

mindestens einem genetischen Kontrollelement (beispielsweise einem Promotor), das eine Expression in einem Organismus, bevorzugt in Pflanzen, gewährleistet, vorzugsweise Epidermis-spezifisch. Soll das Expressionskonstrukt direkt in die Pflanze eingeführt werden, so sind pflanzenspezifische genetische Kontrollelemente (beispielsweise Promotoren) bevorzugt, wobei aus dem oben gesagten die Epidermis-spezifische Aktivität des Promoters in den meisten Ausführungsformen wie oben beschrieben zwingend ist.

[0072] Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung eines Promotors mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der transgenen Expression der Nukleinsäuresequenz, je nach Anordnung der Nukleinsäuresequenzen zu sense oder anti-sense RNA, erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben (cis- bzw. trans-Lokalisation). Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter der als Promoter fungierenden Sequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.

[0073] Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung als auch die Herstellung einer Expressionskassette kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in Maniatis T., Fritsch E.F. und Sambrook J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY) (1989), in Silhavy T.J., Berman M.L. und Enquist L.W., Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY) (1984), in Ausubel F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) und bei Gelvin et al. in Plant Molecular Biology Manual (1990) beschrieben sind. Zwischen beide Sequenzen können aber auch weitere Sequenzen positioniert werden, die zum Beispiel die Funktion eines Linkers mit bestimmten Restriktionsenzymstellen oder eines Signalpeptides haben. Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expression von Fusionsproteinen führen. Bevorzugt kann die Expressionskassette, bestehend aus einer Verknüpfung von Promoter und zu exprimierender Nukleinsäuresequenz, integriert in einem Vektor vorliegen und durch zum Beispiel Transformation in ein pflanzliches Genom inseriert werden. Die Kontrollelemente vermitteln bevorzugt eine Epidermis-spezifische Expression.

[0074] "Ungefähr" meint im Zusammenhang mit Zahlen- oder Größenangaben einen Zahlen- oder Größenbereich um den angegebenen Zahlen- oder Größenwert herum. Im allgemeinen meint der Begriff ungefähr einen Bereich von jeweils 10% des angegebenen Wertes nach oben und nach unten.

[0075] Eingeschlossen unter dem Begriff "Pflanze" sind die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprossen und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut, Pflanzenorgane, Gewebe, Protoplasten, Kallus und andere Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen, sowie alle anderen Arten von Gruppierungen von Pflanzenzellen zu funktionellen oder strukturellen Einheiten. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium.

[0076] "Pflanze" umfaßt alle einjährigen und mehrjährige Pflanzen.

[0077] "Pathogenresistenz" meint das Vermindern oder Abschwächen von Krankheitssymptomen einer Pflanze infolge eines Befalls durch mindestens ein Pathogen. Die Symptome können vielfältiger Art sein, umfassen aber bevorzugt solche die direkt oder indirekt zu einer Beeinträchtigung Qualität der Pflanze, der Quantität des Ertrages, der Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel führen oder aber auch Aussaat, Anbau, Ernte oder Prozessierung des Erntegutes erschweren. Insbesondere ist für der Zwecke der vorliegenden Erfindung die Pathogentoleranz als von der Pathogenresistenz umfasst anzusehen.

[0078] "Verleihen", "bestehen", "erzeugen" oder "erhöhen" einer Resistenz meint, dass die Abwehrmechanismen einer bestimmten Pflanzenart oder -sorte durch Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens im Vergleich zu dem Wildtyp der Pflanze ("Ausgangspflanze"), auf den das erfindungsgemäße Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonsten im wesentlichen gleichen Bedingungen (wie beispielsweise Klima- oder Anbaubedingungen, Stress- oder Pathogenart etc.) eine erhöhte Resistenz gegen ein und mehrere Pathogene aufweist. Dabei äußert sich die erhöhte Resistenz bevorzugt in einer verminderten Ausprägung der Krankheitssymptome, wobei Krankheitssymptome - neben den oben erwähnten Beeinträchtigungen - auch beispielsweise die Penetrationseffizienz eines Pathogens in die Pflanze oder pflanzliche Zellen oder die Proliferationseffizienz in oder auf denselben umfaßt. Dabei sind die Krankheitssymptome bevorzugt um mindestens 5 %, 10 % oder mindestens 20 %, besonders bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens 90 % oder 95 % vermindert.

[0079] "Auswahl" meint in Bezug auf Pflanzen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangspflanze - die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht oder erhöht ist, all die Verfahren, die eine zur Erkennung einer vorliegenden oder erhöhten Pathogenresistenz geeignet sind. Dies können beispielsweise Symptome der Pathogeninfektion sein (z.B. Nekrosen-Ausbildung bei Pilzinfektion) aber auch die oben beschriebenen Symptome umfassen, die

EP 2 081 954 B1

die Qualität der Pflanze, die Quantität des Ertrages, die Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel usw. betreffen.

[0080] "Pathogen" meint mindestens einen biotrophen Pilz aus dem Genus *Phakopsora*. Es ist jedoch anzunehmen, dass die mesophyll-spezifische Expression eines BI1-Proteins auch eine Resistenz gegen weitere Pathogene bewirkt, da insgesamt eine Resistenz gegen Streßfaktoren erzeugt wird.

[0081] Beispielsweise jedoch nicht einschränkend seien nachfolgende Pathogene zu nennen:

1. Pilzpathogene oder pilz-ähnliche Pathogene:

[0082] Pilzpathogene oder pilz-ähnliche Pathogene (wie z.B. Chromista) stammen vorzugsweise aus der Gruppe umfassend Plasmodiophoromycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten, Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten (Fungi imperfecti). Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 1 bis 4 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen. Folgende englische und deutsche Termini können alternativ verwendet werden:

Ährenfäule	ear rot / head blight
Stengelfäule	stalk rot
Wurzelfäule	root rot
Rost	rust
Falscher Mehltau	downy mildew

Tabelle 1: Erkrankungen hervorgerufen durch biotrophe, phytopathogene Pilze

Erkrankung	Pathogen
Braunrost	<i>Puccinia recondita</i>
Gelbrost	<i>P. striiformis</i>
Echter Mehltau	<i>Erysiphe graminis</i> / <i>Blumeria graminis</i>
Rost (gemeiner Mais)	<i>Puccinia sorghi</i>
Rost (südlicher Mais)	<i>Puccinia polysora</i>
Tabak Blattflecken	<i>Cercospora nicotianae</i>
Rost (Soja)	<i>Phakopsora pachyrhizi</i> , <i>P. meibomia</i>
Rost (tropischer Mais)	<i>Physopella pallescens</i> , <i>P. zeae</i> = <i>Angiopsora zeae</i>

Tabelle 2: Erkrankungen hervorgerufen durch nekrotrophe und/oder hemibiotrophe Pilze und Oomyceten

Erkrankung	Pathogen
Spelzenbräune	<i>Septoria (Stagonospora) nodorum</i>
Blattdürre	<i>Septoria tritici</i>
Ährenfusariosen	<i>Fusarium</i> spp.
Halmbruchkrankheit	<i>Pseudocercospora herpotrichoides</i>
Flugbrand	<i>Ustilago</i> spp.
Kraut- und Knollenfäule	<i>Phytophthora infestans</i>
Weizensteinbrand	<i>Tilletia caries</i>
Schwarzbeinigkeit	<i>Gaeumannomyces graminis</i>
Anthracnose leaf blight Anthracnose stalk rot	<i>Colletotrichum graminicola</i> (teleomorph: <i>Glomerella graminicola</i> Politis); <i>Glomerella tucumanensis</i> (anamorph: <i>Glomerella falcatum</i> Went)

EP 2 081 954 B1

(fortgesetzt)

	Erkrankung	Pathogen
	Aspergillus ear and kernel rot	Aspergillus flavus
5	Banded leaf and sheath spot ("Wurzeltöter")	Rhizoctonia solani Kuhn = Rhizoctonia microsclerotia J. Matz (telomorph: Thanatephorus cucumeris)
	Black bundle disease	Acremonium strictum W. Gams = alosporium acremonium Auct. non Corda
10	Black kernel rot	Lasiodiplodia theobromae = Botryodiplodia theobromae
	Borde blanco	Marasmiellus sp.
	Brown spot (black spot, stalk rot)	Physoderma maydis
15	Cephalosporium kernel rot	Acremonium strictum = Cephalosporium acremonium
	Charcoal rot	Macrophomina phaseolina
	Corticium ear rot	Thanatephorus cucumeris = Corticium sasakii
20	Curvularia leaf spot	Curvularia clavata, C. eragrostidis, = C. maculans (teleomorph: Cochliobolus eragrostidis), Curvularia inaequalis, C. intermedia (teleomorph: Cochliobolus intermedius), Curvularia lunata (teleomorph: Cochliobolus lunatus), Curvularia pallescens (teleomorph: Cochliobolus pallescens), Curvularia senegalensis, C. tuberculata (teleomorph: Cochliobolus tuberculatus)
25		
	Didymella leaf spot	Didymella exitalis
	Diplodia Ähren- und Stengelfäule	Diplodia frumenti (teleomorph: Botryosphaeria festucae)
30	Diplodia Ähren- und Stengelfäule, seed rot and seedling blight	Diplodia maydis = Stenocarpella maydis
	Diplodia leaf spot or streak	Stenocarpella macrospora = Diplodia leaf macrospora
	Brown stripe downy mildew	Sclerophthora rayssiae var. zeae
35	Crazy top downy mildew	Sclerophthora macrospora = Sclerospora macrospora
	Green ear downy mildew (graminicola downy mildew)	Sclerospora graminicola
	Dry ear rot (cob, kernel and stalk rot)	Nigrospora oryzae (teleomorph: Khuskia oryzae)
40	Ährenfäulen (minor)	Alternaria alternata = A. tenuis, Aspergillus glaucus, A. niger, Aspergillus spp., Botrytis cinerea (teleomorph: Botryotinia fuckeliana), Cunninghamella sp., Curvularia pallescens, Doratomyces stemonitis = Cephalotrichum stemonitis, Fusarium culmorum, Gonatobotrys simplex, Pithomyces maydicus, Rhizopus microsporus Tiegh., R. stolonifer = R. nigricans, Scopulariopsis brumptii
45		
	Ergot (horse's tooth)	Claviceps gigantea (anamorph: Sphacelia sp.)
	Eyespot	Aureobasidium zeae = Kabatiella zeae
50	Fusarium Ähren- und Stengelfäule	Fusarium subglutinans = F. moniliforme var. subglutinans
	Fusarium kernel, root and stalk rot, seed rot and seedling blight	Fusarium moniliforme (teleomorph: Gibberella fujikuroi)
	Fusarium Stengelfäule, seedling root rot	Fusarium avenaceum (teleomorph: Gibberella avenacea)
55	Gibberella Ähren- u. Stengelfäule	Gibberella zeae (anamorph: Fusarium graminearum)

EP 2 081 954 B1

(fortgesetzt)

	Erkrankung	Pathogen
5	Graue Ährenfäule	Botryosphaeria zeae = Physalospora zeae (anamorph: Macrophoma zeae)
	Gray leaf spot (Cercospora leaf spot)	Cercospora sorghi = C. sorghi var. maydis, C. zeae-maydis
10	Helminthosporium root rot	Exserohilum pedicellatum = Helminthosporium pedicellatum (teleomorph: Setosphaeria pedicellata)
	Hormodendrum Ährenfäule (Cladosporium Fäule)	Cladosporium cladosporioides = Hormodendrum cladosporioides, C. herbarum (teleomorph: Mycosphaerella tassiana)
15	Leaf spots, minor	Alternaria alternata, Ascochyta maydis, A. tritici,
20		A. zeicola, Bipolaris victoriae = Helminthosporium victoriae (teleomorph: Cochliobolus victoriae), C. sativus (anamorph: Bipolaris sorokiniana = H. sorokinianum = H. sativum), Epicoccum nigrum, Exserohilum prolatum = Drechslera prolata (teleomorph: Setosphaeria prolata) Graphium penicillioides, Leptosphaeria maydis, Leptothyrium zeae, Ophiosphaerella herpotricha, (anamorph: Scolecosporella sp.), Paraphaeosphaeria michotii, Phoma sp., Septoria zeae, S. zeicola, S. zeina
25	Northern corn leaf blight (white blast, crown stalk rot, stripe)	Setosphaeria turcica (anamorph: Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum)
	Northern corn leaf spot Helminthosporium ear rot (race 1)	Cochliobolus carbonum (anamorph: Bipolaris zeicola = Helminthosporium carbonum)
30	Penicillium Ährenfäule (blue eye, blue mold)	Penicillium spp., P. chrysogenum, P. expansum, P. oxalicum
	Phaeocystostroma Stengel- und Wurzelfäule	Phaeocystostroma ambiguum, = Phaeocystosporella zeae
35	Phaeosphaeria leaf spot	Phaeosphaeria maydis = Sphaerulina maydis
	Physalospora Ährenfäule (Botryosphaeria Ährenfäule)	Botryosphaeria festucae = Physalospora zeicola (anamorph: Diplodia frumenti)
	Purple leaf sheath	Hemiparasitic bacteria and fungi
40	Pyrenochaeta Stengel- und Wurzelfäule	Phoma terrestris = Pyrenochaeta terrestris
	Pythium Wurzelfäule	Pythium spp., P. arrhenomanes, P. graminicola
	Pythium Stengelfäule	Pythium aphanidermatum = P. butleri L.
45	Red kernel disease (ear mold, leaf and seed rot)	Epicoccum nigrum
	Rhizoctonia Ährenfäule (sclerotial rot)	Rhizoctonia zeae (teleomorph: Waitea circinata)
	Rhizoctonia Wurzel- und Stengelfäule	Rhizoctonia solani, Rhizoctonia zeae
50	Wurzelfäulen (minor)	Alternaria alternata, Cercospora sorghi, Dictyochoeta fertilis, Fusarium acuminatum (teleomorph: Gibberella acuminata), F. equiseti (tele-
55		omorph: G. intricans), F. oxysporum, F. pallidoroseum, F. poae, F. roseum, G. cyanogena, (anamorph: F. sulphureum), Microdochium bolleyi, Mucor sp., Periconia circinata, Phytophthora cactorum, P. drechsleri, P. nicotianae var. parasitica, Rhizopus arrhizus

EP 2 081 954 B1

(fortgesetzt)

	Erkrankung	Pathogen
5	Rostratum leaf spot (Helminthosporium leaf disease, ear and stalk rot)	Setosphaeria rostrata, (anamorph: xserohilum rostratum = He/minthosporium rostratum)
	Falscher Java Mehltau	Peronosclerospora maydis = Sclerospora maydis
	Falscher Philippinen Mehltau	Peronosclerospora philippinensis = Sclerospora philippinensis
10	Falscher Sorghum Mehltau	Peronosclerospora sorghi = Sclerospora sorghi
	Spontaneum downy mildew	Peronosclerospora spontanea = Sclerospora spontanea
	Falscher Zuckerrohr-Mehltau	Peronosclerospora sacchari = Sclerospora sacchari
15	Sclerotium Ährenfäule (southern blight)	Sclerotium rolfsii Sacc. (teleomorph: Athelia rolfsii)
20	Seed rot-seedling blight	Bipolaris sorokiniana, B. zeicola = Helminthosporium carbonum, Diplodia maydis, Exserohilum pedicellatum, Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum, Fusarium avenaceum, F. culmorum, F. moniliforme, Gibberella zeae (anamorph: F. graminearum), Macrophomina phaseolina, Penicillium spp., Phomopsis sp., Pythium spp., Rhizoctonia solani, R. zeae, Sclerotium rolfsii, Spicaria sp.
25	Selenophoma leaf spot	Selenophoma sp.
	Sheath rot	Gaeumannomyces graminis
	Shuck rot	Myrothecium gramineum
	Silage mold	Monascus purpureus, M ruber
30	Flugbrand (Smut, common)	Ustilago zeae = U. maydis
	Smut, false	Ustilaginoidea virens
	Kolbenbrand (Smut, head)	Sphacelotheca reiliana = Sporisorium holcisorghi
35	Southern corn leaf blight and stalk rot	Cochliobolus heterostrophus (anamorph: Bipolaris maydis = Helminthosporium maydis)
	Southern leaf spot	Stenocarpella macrospora = Diplodia macrospora
40	Stengelfäulen (minor)	Cercospora sorghi, Fusarium episphaeria, F. merismoides, F. oxysporum Schlechtend, F. poae, F. roseum, F. solani (teleomorph: Nectria haematococca), F. tricinatum, Mariannaea elegans, Mucor sp., Rhopoglyphus zeae, Spicaria sp.
45	Lagerfäulen (Storage rots)	Aspergillus spp., Penicillium spp. und weitere Pilze
	Tar spot	Phyllachora maydis
	Trichoderma ear rot and root rot	Trichoderma viride = T. lignorum teleomorph: Hypocrea sp.
50	White ear rot, root and stalk rot	Stenocarpella maydis = Diplodia zeae
	Yellow leaf blight	Ascochyta ischaemi, Phyllosticta maydis (teleomorph: Mycosphaerella zeae-maydis)
	Zonate leaf spot	Gloeocercospora sorghi

55

EP 2 081 954 B1

Tabelle 4: Erkrankungen hervorgerufen durch Pilze und Oomyceten mit unklarer Einstufung hinsichtlich biotrophen, hemibiotrophen bzw. nekrotrophen Verhaltens

Erkrankung	Pathogen
Hyalothyridium leaf spot	Hyalothyridium maydis
Late wilt	Cephalosporium maydis

Besonders bevorzugt sind

[0083]

- Plasmodiophoromycota wie Plasmodiophora brassicae (Kohlhernie), Spongospora subterranea, Polymyxa graminis,
- Oomycota wie Bremia lactucae (Falscher Mehltau an Salat), Peronospora (Falscher Mehltau) bei Löwenmaul (*P. antirrhini*), Zwiebel (*P. destructor*), Spinat (*P. effusa*), Sojabohne (*P. manchurica*), Tabak (Blauschimmel; *P. tabacina*) Alfalfa und Klee (*P. trifolium*), Pseudoperonospora humuli (Falscher Mehltau an Hopfen), Plasmopara (Falscher Mehltau bei Trauben) (*P. viticola*) und Sonnenblume (*P. halstedii*), Sclerophthora macrospora (Falscher Mehltau bei Cerealien und Gäsern), Pythium (z.B. Wurzelbrand an Beta-Rübe durch *P. debaryanum*), Phytophthora infestans (Kraut- und Knollenfäule bei Kartoffel, Braunfäule bei Tomate etc.), Albugo spec.
- Ascomycota wie Microdochium nivale (Schneeschimmel an Roggen und Weizen), Fusarium graminearum, Fusarium culmorum (Ährenfäule v.a. bei Weizen), Fusarium oxysporum (Fusarium-Welke an Tomate), Blumeria graminis (Echter Mehltau an Gerste (f.sp. hordei) und Weizen (f.sp. tritici)), Erysiphe pisi (Erbsenmehltau), Nectria galligena (Obstbaumkrebs), Unicula necator (Echter Mehltau der Weinrebe), Pseudopeziza tracheiphila (Roter Brenner der Weinrebe), Claviceps purpurea (Mutterkorn an z.B. Roggen und Gräsern), Gaeumannomyces graminis (Schwarzbeinigkeit an Weizen, Roggen u.a. Gräsern), Magnaporthe grisea, Pyrenophora graminea (Streifenkrankheit an Gerste), Pyrenophora teres (Netzfleckenkrankheit an Gerste), Pyrenophora tritici-repentis (Blattfleckenkrankheit (Blattdürre) an Weizen), Venturia inaequalis (Apfelschorf), Sclerotinia sclerotium (Weißstengeligkeit, Rapskrebs), Pseudopeziza medicaginis (Klappenschorf an Luzerne, Weiß- und Rotklee).
- Basidiomyceten wie Typhula incamata (Typhula-Fäule an Gerste, Roggen, Weizen), Ustilago maydis (Beulenbrand an Mais), Ustilago nuda (Flugbrand an Gerste), Ustilago tritici (Flugbrand an Weizen, Dinkel), Ustilago avenae (Flugbrand an Hafer), Rhizoctonia solani (Wurzeltöter an Kartoffeln), Sphacelotheca spp. (Kolbenbrand bei Sorghum), Melampsora lini (Rost bei Flachs), Puccinia graminis (Schwarzrost an Weizen, Gerste, Roggen, Hafer), Puccinia recondita (Braunrost an Weizen), Puccinia dispersa (Braunrost an Roggen), Puccinia hordei (Braunrost an Gerste), Puccinia coronata (Kronenrost an Hafer), Puccinia striiformis (Gelbrost an Weizen, Gerste, Roggen sowie zahlreichen Gräsern), Uromyces appendiculatus (Bohnenrost), Sclerotium rolfsii (Wurzel- und Stengelfäule bei zahlreichen Pflanzen).
- Deuteromyceten (Fungi imperfecti) wie Septoria (Stagonospora) nodorum (Spelzenbräune) an Weizen (Septoria tritici), Pseudocercospora herpotrichoides (Halmbruchkrankheit an Weizen, Gerste, Roggen), Rynchosporium secalis (Blattfleckenkrankheit an Roggen und Gerste), Alternaria solani (Dürrfleckenkrankheit an Kartoffel, Tomate), Phoma betae (Wurzelbrand an Beta-Rübe), Cercospora beticola (Cercospora-Blattfleckenkrankheit an Beta-Rübe), (Alternaria brassicae (Rapschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblütlern), Verticillium dahliae (Rapswelke und -stengelfäule), Colletotrichum lindemuthianum (Brennfleckenkrankheit an Bohne), Phoma lingam - Umfallkrankheit (Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps), Botrytis cinerea (Grauschimmel an Weinrebe, Erdbeere, Tomate, Hopfen etc.).

[0084] Besonders bevorzugt sind biotrophe Pathogene, und unter diesen insbesondere heminekrotrophe Pathogene, d.h. Phakopsora pachyrhizi und/oder jene, die im wesentlichen einen ähnlichen Infektionsmechanismus wie Phakopsora pachyrhizi, wie er hierin beschrieben ist, aufweisen. Insbesondere bevorzugt sind Pathogene aus der Gruppe der Uredinales (Rostpilze), und unter diesen besonders die Melampsoraceae. Besonders bevorzugt sind Phakopsora pachyrhizi und/oder Phakopsora meibomiaae.

2. Bakterielle Pathogene:

[0085] Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 5 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

EP 2 081 954 B1

Tabelle 5: Bakterielle Erkrankungen

Erkrankung	Pathogen
Bacterial leaf blight and stalk rot	<i>Pseudomonas avenae</i> subsp. <i>avenae</i>
Bacterial leaf spot	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>holcicola</i>
Bakterielle Stengelfäule	<i>Enterobacter dissolvens</i> = <i>Erwinia dissolvens</i>
Schwarzbeinigkei ("Bacterial stalk and top rot")	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> , <i>Erwinia chrysanthemi</i> pv. <i>zeae</i>
Bacterial stripe	<i>Pseudomonas andropogonis</i>
Chocolate spot	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i>
Goss's bacterial wilt and blight (leaf freckles and wilt)	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> = <i>Corynebacterium michiganense</i> pv. <i>andnebraskense</i>
Holcus spot	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
Purple leaf sheath	Hemiparasitic bacteria
Seed rot-seedling blight	<i>Bacillus subtilis</i>
Stewart's disease (bacterial wilt)	<i>Pantoea stewartii</i> = <i>Erwinia stewartii</i>
Corn stunt (achapparramiento, maize stunt, Mesa Central or Rio Grande maize stunt)	<i>Spiroplasma kunkelii</i>

3. Virale Pathogene:

[0086] "Virale Pathogene" schließt sämtliche Pflanzenviren ein wie beispielsweise Tabak- oder oder Cucumber-Mosaik Virus, Ringspot-Virus, Nekrose-Virus, Mais Dwarf-Mosaic Virus etc.

[0087] Beispielhaft jedoch nicht einschränkend sind die in Tabelle 6 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

Tabelle 6: Virale Erkrankungen

Krankheit	Pathogen
American wheat striate (wheat striate mosaic)	American wheat striate mosaic virus (AWSMV)
Barley stripe mosaic	Barley stripe mosaic virus (BSMV)
Barley yellow dwarf	Barley yellow dwarf virus (BYDV)
Brome mosaic	Brome mosaic virus (BMV)
Cereal chlorotic mottle	Cereal chlorotic mottle virus (CCMV)
Corn chlorotic vein banding (Brazilian maize mosaic)	Corn chlorotic vein banding virus (CCVBV)
Corn lethal necrosis	Viruskomplex aus Maize chlorotic mottle virus (MCMV) und Maize dwarf mosaic virus (MDMV) A oder B oder Wheat streak mosaic virus (WSMV)
Cucumber mosaic	Cucumber mosaic virus (CMV)
Cynodon chlorotic streak	Cynodon chlorotic streak virus (CCSV)
Johnsongrass mosaic	Johnsongrass mosaic virus (JGMV)
Maize bushy stunt	Mycoplasma-like organism (MLO) associated
Maize chlorotic dwarf	Maize chlorotic dwarf virus (MCDV)
Maize chlorotic mottle	Maize chlorotic mottle virus (MCMV)
Maize dwarf mosaic	Maize dwarf mosaic virus (MDMV) strains A, D, E and F
Maize leaf fleck	Maize leaf fleck virus (MLFV)

EP 2 081 954 B1

(fortgesetzt)

	Krankheit	Pathogen
5	Maize line	Maize line virus (MLV)
	Maize mosaic (corn leaf stripe, enanismo rayado)	Maize mosaic virus (MMV)
	Maize mottle and chlorotic stunt	Maize mottle and chlorotic stunt virus
	Maize pellucid ringspot	Maize pellucid ringspot virus (MPRV)
10	Maize raya gruesa	Maize raya gruesa virus (MRGV)
	maize rayado fino (fine striping disease)	Maize rayado fino virus (MRFV)
	Maize red leaf and red stripe	Mollicute
	Maize red stripe	Maize red stripe virus (MRSV)
15	Maize ring mottle	Maize ring mottle virus (MRMV)
	Maize rio IV	Maize rio cuarto virus (MRCV)
	Maize rough dwarf (nanismo ruvido)	Maize rough dwarf virus (MRDV) (Cereal tillering disease virus)
20	Maize sterile stunt	Maize sterile stunt virus (strains of barley yellow striate virus)
	Maize streak	Maize streak virus (MSV)
25	Maize stripe (maize chlorotic stripe, maize hoja blanca)	Maize stripe virus
	Maize stunting	Maize stunting virus
	Maize tassel abortion	Maize tassel abortion virus (MTAV)
	Maize vein enation	Maize vein enation virus (MVEV)
30	Maize wallaby ear	Maize wallaby ear virus (MWEV)
	Maize white leaf	Maize white leaf virus
	Maize white line mosaic	Maize white line mosaic virus (MWLMV)
35	Millet red leaf	Millet red leaf virus (MRLV)
	Northern cereal mosaic	Northern cereal mosaic virus (NCMV)
	Oat pseudorosette (zakuklivanie)	Oat pseudorosette virus
	Oat sterile dwarf	Oat sterile dwarf virus (OSDV)
40	Rice black-streaked dwarf	Rice black-streaked dwarf virus (RBSDV)
	Rice stripe	Rice stripe virus (RSV)
	Sorghum mosaic	Sorghum mosaic virus (SrMV) (auch: sugarcane mosaic virus (SCMV) Stämme H, I and M)
45	Sugarcane Fiji disease	Sugarcane Fiji disease virus (FDV)
	Sugarcane mosaic	Sugarcane mosaic virus (SCMV) strains A, B, D, E, SC, BC, Sabi and MB (formerly MDMV-B)
50	Wheat spot mosaic	Wheat spot mosaic virus (WSMV)

4. Tierische Schädlinge

4.1 Insekten Pathogene:

55

[0088] Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien Insekten wie beispielsweise Käfer, Raupen, Läuse oder Milben zu nennen.

EP 2 081 954 B1

[0089] Bevorzugt sind Insekten der Gattungen Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Anoplura, Siphonaptera, Trichoptera, etc.. Besonders bevorzugt sind Coleoptera and Lepidoptera Insekten, wie beispielsweise den Maiszünsler (European Corn Borer), *Diabrotica barberi*, *Diabrotica undecimpunctata*, *Diabrotica virgifera*, *Agrotis ipsilon*, *Crymodes devastator*, *Feltia ducens*, *Agrotis gladiaria*, *Melanotus* spp., *Aeolus mellillus*, *Aeolus mancus*, *Horistonotus uhlerii*, *Sphenophorus maidis*, *Sphenophorus zaeae*, *Sphenophorus parvulus*, *Sphenophorus callosus*, *Phyllogphaga* spp., *Anuraphis maidiradicis*, *Delia platura*, *Colaspis brunnea*, *Stenolophus lecontei* und *Clivinia impressifrons*.

[0090] Ferner sind zu nennen: Das Getreidehähnchen (*Oulema melanopus*), die Fritfliege (*Oscinella frit*), Drahtwürmer (*Agrotis lineatus*) und Blattläuse (wie z.B. Haferblattlaus *Rhopalosiphum padi*, Grosse Getreideblattlaus *Sitobion avenae*).

4.2 Nematoden:

[0091] Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 7 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

Tabelle 7: Parasitäre Nematoden

Schädigung	Pathogene Nematode
Awl	<i>Dolichodorus</i> spp., <i>D. heterocephalus</i>
Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen	<i>Ditylenchus dipsaci</i>
Burrowing	<i>Radopholus similis</i>
Haferzystenälchen	<i>Heterodera avenae</i> , <i>H. zaeae</i> , <i>Punctodera chaltoensis</i>
Dagger	<i>Xiphinema</i> spp., <i>X. americanum</i> , <i>X. mediterraneum</i>
False root-knot	<i>Nacobbus dorsalis</i>
Lance, Columbia	<i>Hoplolaimus columbus</i>
Lance	<i>Hoplolaimus</i> spp., <i>H. galeatus</i>
Lesion	<i>Pratylenchus</i> spp., <i>P. brachyurus</i> , <i>P. crenatus</i> , <i>P. hexincisus</i> , <i>P. neglectus</i> , <i>P. penetrans</i> , <i>P. scribneri</i> , <i>P. thornei</i> , <i>P. zaeae</i>
Needle	<i>Longidorus</i> spp., <i>L. breviannulatus</i>
Ring	<i>Criconemella</i> spp., <i>C. ornata</i>
Wurzelgallenälchen	<i>Meloidogyne</i> spp., <i>M. chitwoodi</i> , <i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i>
Spiral	<i>Helicotylenchus</i> spp.
Sting	<i>Belonolaimus</i> spp., <i>B. longicaudatus</i>
Stubby-root	<i>Paratrichodorus</i> spp., <i>P. christiei</i> , <i>P. minor</i> , <i>Quinisulcius acutus</i> , <i>Trichodorus</i> spp.
Stunt	<i>Tylenchorhynchus dubius</i>

[0092] Ganz besonders bevorzugt sind *Globodera rostochiensis* und *G. pallida* (Zystenälchen an Kartoffel, Tomate u.a. Nachtschattengewächsen), *Heterodera schachtii* (Rübenzystenälchen an Zucker- und Futterrübe, Raps, Kohl etc.), *Heterodera avenae* (Haferzystenälchen an Hafer u.a. Getreidearten), *Ditylenchus dipsaci* (Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen an Roggen, Hafer, Mais, Klee, Tabak, Rübe), *Anguina tritici* (Weizenälchen, Radekrankheit an Weizen (Dinkel, Roggen)), *Meloidogyne hapla* (Wurzelgallenälchen an Möhre, Gurke, Salat, Tomate, Kartoffel, Zuckerrübe, Luzerne).

[0093] Als für die einzelnen Sorten bevorzugte Pilz- oder Virus-Pathogene sind beispielsweise zu nennen:

1. Gerste:

[0094] Pilz-, bakterielle und virale Pathogene: *Puccinia graminis* f.sp. *hordei*, barley yellow dwarf virus (BYDV).

[0095] Pathogene Insekten / Nematoden: *Ostrinia nubilalis* (European corn borer); *Agrotis ipsilon*; *Schizaphis graminum*; *Blissus leucopterus leucopterus*; *Acrosternum hilare*; *Euschistus servus*; *Deliaplatura*; *Mayetiola destructor*; *Pe-*

trobia latens.

2. Sojabohne:

- 5 **[0096]** Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Phytophthora megasperma* fsp.glycinea, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* (*Phomopsis sojae*), *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, *Sclerotium rolfsii*, *Cercospora kikuchii*, *Cercospora sojae*, *Peronospora manshurica*, *Colletotrichum dematium* (*Colletotrichum truncatum*), *Corynespora cassiicola*, *Septoria glycines*, *Phyllosticta sojicola*, *Alternaria alternata*, *Pseudomonas syringae* p.v. *glycinea*, *Xanthomonas campestris* p.v. *phaseoli*, *Microsphaera* *diffusa*, *Fusarium semitectum*, *Phialophora gregata*, Sojabohnen Mosaikvirus, Sojabohnenrost, *Glomerella glycines*, Tobacco Ring spot virus, Tobacco Streak virus, *Phakopsorapachyrhizi*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*, *Pythium debaryanum*, Tomato spotted wilt virus, *Heterodera glycines* *Fusarium solani*; insbesondere Sojabohnenrost.
- 10 **[0097]** Pathogene Insekten / Nematoden: *Pseudoplusia includens*; *Anticarsia gemmatalis*; *Plathyrena scabra*; *Ostrinia nubilalis*; *Agrotis ipsilon*; *Spodoptera exigua*; *Heliothis virescens*; *Helicoverpa zea*; *Epilachna varivestis*; *Myzus persicae*; *Empoasca fabae*; *Acrosternum hilare*; *Melanoplus femurrubrum*; *Melanoplus differentialis*; *Hylemya platyura*; *Sericothrips variabilis*; *Thrips tabaci*; *Tetranychus turkestani*; *Tetranychus urticae*.
- 15

3. Raps:

- 20 **[0098]** Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Albugo candida*, *Alternaria brassicae*, *Leptosphaeria maculans*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycosphaerella brassicicola*, *Pythium ultimum*, *Peronospora parasitica*, *Fusarium roseum*, *Alternaria alternata*.

4. Alfalfa:

- 25 **[0099]** Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Clavibacter michiganense* subsp. *insidiosum*, *Pythium ultimum*, *Pythium irregulare*, *Pythium splendens*, *Pythium debaryanum*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora megasperma*, *Peronospora trifoliorum*, *Phoma medicaginis* var. *medicaginis*, *Cercospora medicaginis*, *Pseudopeziza medicaginis*, *Leptotrichia medicaginis*, *Fusarium*, *Xanthomonas campestris* p.v. *alfalfae*, *Aphanomyces euteiches*, *Stemphylium herbarum*, *Stemphylium alfalfae*.
- 30

5. Weizen:

- 35 **[0100]** Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Pseudomonas syringae* p.v. *atrofaciens*, *Urocystis agropyri*, *Xanthomonas campestris* p.v. *translucens*, *Pseudomonas syringae* p.v. *syringae*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Ustilago tritici*, *Ascochyta tritici*, *Cephalosporium gramineum*, *Colletotrichum graminicola*, *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*, *Puccinia striiformis*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Septoria* (*Stagonospora*) *nodorum*, *Septoria tritici*, *Septoria avenae*, *Pseudocercospora herpotrichoides*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia cerealis*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium ultimum*, *Bipolaris sorokiniana*, Barley Yellow Dwarf Virus, Brome Mosaic Virus, Soil Borne Wheat Mosaic Virus, Wheat Streak Mosaic Virus, Wheat Spindle Streak Virus, American Wheat Striate Virus, *Claviceps purpurea*, *Tilletia tritici*, *Tilletia laevis*, *Ustilago tritici*, *Tilletia indica*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium graminicola*, *Pythium aphanidermatum*, High Plains Virus, European Wheat Striate Virus, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* (Wheat stem rust), *Blumeria* (*Erysiphe*) *graminis* f.sp. *tritici* (Wheat Powdery Mildew).
- 40 **[0101]** Pathogene Insekten / Nematoden: *Pseudaletia unipunctata*; *Spodoptera frugiperda*; *Elasmopalpus lignosellus*; *Agrotis orthogonia*; *Elasmopalpus lignosellus*; *Oulema melanopus*; *Hypera punctata*; *Diabrotica undecimpunctata howardi*; Russian wheat aphid; *Schizaphis graminum*; *Macrosiphum avenae*; *Melanoplus femurrubrum*; *Melanoplus differentialis*; *Melanoplus sanguinipes*; *Mayetiola destructor*; *Sitodiplosis mosellana*; *Meromyza americana*; *Hylemya coarctata*; *Frankliniella fusca*; *Cephus cinctus*; *Aceria tulipae*.
- 50

6. Sonnenblume:

- 55 **[0102]** Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Plasmophora halstedii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, Aster Yellows, *Septoria helianthi*, *Phomopsis helianthi*, *Alternaria helianthi*, *Alternaria zinniae*, *Botrytis cinerea*, *Phoma macdonaldii*, *Macrophomina phaseolina*, *Erysiphe cichoracearum*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus stolonifer*, *Puccinia helianthi*, *Verticillium dahliae*, *Erwinia carotovorum* p.v. *Carotovora*, *Cephalosporium acremonium*, *Phytophthora cryptogea*, *Albugo tragopogonis*.

EP 2 081 954 B1

[0103] Pathogene Insekten / Nematoden: *Suleima helianthana*; *Homoeosoma electellum*; *zygogramma exclamationis*; *Bothyrus gibbosus*; *Neolasioptera murtfeldtiana*.

7. Mais:

5
10
15
20
25
[0104] Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*, *Erwinia stewartii*, *Fusarium moniliforme*, *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*), *Stenocarpella maydi* (*Diplodia maydis*), *Pythium irregulare*, *Pythium debaryanum*, *Pythium graminicola*, *Pythium splendens*, *Pythium ultimum*, *Pythium aphanidermatum*, *Aspergillus flavus*, *Bipolaris maydis* 0, T (*Cochliobolus heterostrophus*), *Helminthosporium carbonum* I, II & III (*Cochliobolus carbonum*), *Exserohilum turcicum* I, II & III, *Helminthosporium pedicellatum*, *Physoderma maydis*, *Phyllosticta maydis*, *Kabatella maydis*, *Cercospora sorghi*, *Ustilago maydis*, *Puccinia sorghi*, *Puccinia polysora*, *Macrophomina phaseolina*, *Penicillium oxalicum*, *Nigrospora oryzae*, *Cladosporium herbarum*, *Curvularia lunata*, *Curvularia inaequalis*, *Curvularia pallescens*, *Clavibacter michiganense* subsp. *nebraskense*, *Trichoderma viride*, *Maize Dwarf Mosaic Virus A & B*, *Wheat Streak Mosaic Virus*, *Maize Chlorotic Dwarf Virus*, *Claviceps sorghi*, *Pseudomonas avenae*, *Erwinia chrysanthemi* p.v. *Zea*, *Erwinia corotovora*, *Cornstunt Spiroplasma*, *Diplodia macrospora*, *Sclerophthora macrospora*, *Peronosclerospora sorghi*, *Peronosclerospora philippinensis*, *Peronosclerospora maydis*, *Peronosclerospora sacchari*, *Spacelotheca reiliana*, *Physopella zeae*, *Cephalosporium maydis*, *Cephalosporium acremonium*, *Maize Chlorotic Mottle Virus*, *High Plains Virus*, *Maize Mosaic Virus*, *Maize Rayado Fino Virus*, *Maize Streak Virus (MSV, Maisstrichel-Virus)*, *Maize Stripe Virus*, *Maize Rough Dwarf Virus*.

[0105] Pathogene Insekten / Nematoden: *Ostrinia nubilalis*; *Agrotis ipsilon*; *Helicoverpa zea*; *Spodoptera frugiperda*; *Diatraea grandiosella*; *Elasmopalpus lignosellus*; *Diatraea saccharalis*; *Diabrotica virgifera*; *Diabrotica longicornis barberi*; *Diabrotica undecimpunctata howardi*; *Melanotus* spp.; *Cyclocephala borealis*; *Cyclocephala immaculata*; *Popillia japonica*; *Chaetocnema pulicaria*; *Sphenophorus maidis*; *Rhopalosiphum maidis*; *Anuraphis maidiradicis*; *Blissus leucopterus leucopterus*; *Melanoplus femurrubrum*; *Melanoplus sanguinipes*; *Hylemya platyura*; *Agromyza parvicornis*; *Anaphothrips obscurus*; *Solenopsis milesta*; *Tetranychus urticae*.

8. Sorghum:

30
35
40
[0106] Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Exserohilum turcicum*, *Colletotrichum graminicola* (*Glomerella graminicola*), *Cercospora sorghi*, *Gloeocercospora sorghi*, *Ascochyta sorghina*, *Pseudomonas syringae* p.v. *syringae*, *Xanthomonas campestris* p.v. *holcicola*, *Pseudomonas andropogonis*, *Puccinia purpurea*, *Macrophomina phaseolina*, *Perconia circinata*, *Fusarium moniliforme*, *Alternaria alternate*, *Bipolaris sorghicola*, *Helminthosporium sorghicola*, *Curvularia lunata*, *Phoma insidiosa*, *Pseudomonas avenae* (*Pseudomonas alboprecipitans*), *Ramulispora sorghi*, *Ramulispora sorghicola*, *Phyllachara sacchari*, *Sporisorium reilianum* (*Sphacelotheca reiliana*), *Sphacelotheca cruenta*, *Sporisorium sorghi*, *Sugarcane mosaic H*, *Maize Dwarf Mosaic Virus A & B*, *Claviceps sorghi*, *Rhizoctonia solani*, *Acremonium strictum*, *Sclerophthora macrospora*, *Peronosclerospora sorghi*, *Peronosclerospora philippinensis*, *Sclerospora graminicola*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium graminicola*.

[0107] Pathogene Insekten / Nematoden: *Chilo partellus*; *Spodoptera frugiperda*; *Helicoverpa zea*; *Elasmopalpus lignosellus*; *Feltia subterranea*; *Phyllophaga crinita*; *Eleodes*, *Conoderus* und *Aeolus* spp.; *Oulema melanopus*; *Chaetocnema pulicaria*; *Sphenophorus maidis*; *Rhopalosiphum maidis*; *Siphaflava*; *Blissus leucopterus leucopterus*; *Contarinia sorghicola*; *Tetranychus cinnabarinus*; *Tetranychus urticae*.

9. Baumwolle:

45
50
[0108] Pathogene Insekten / Nematoden: *Heliopsis virescens*; *Helicoverpa zea*; *Spodoptera exigua*; *Pectinophora gossypiella*; *Anthonomus grandis grandis*; *Aphis gossypii*; *Pseudatomoscelis seriatus*; *Trialeurodes abutilonea*; *Lygus lineolaris*; *Melanoplus femurrubrum*; *Melanoplus differentialis*; *Thrips tabaci* (onion thrips); *Frankliniella fusca*; *Tetranychus cinnabarinus*; *Tetranychus urticae*.

10. Reis:

55
[0109] Pathogene Insekten / Nematoden: *Diatraea saccharalis*; *Spodoptera frugiperda*; *Helicoverpa zea*; *Colaspis brunnea*; *Lissorhoptrus oryzophilus*; *Sitophilus oryzae*; *Nephotettix nigropictus*; *Blissus leucopterus leucopterus*; *Acrosternum hilare*.

11. Raps:

[0110] Pathogene Insekten / Nematoden: *Brevicoryne brassicae*; *Phylotreta cruciferae*; *Mamestra conjugata*; *Plutella*

EP 2 081 954 B1

xylostella; Delia ssp..

[0111] "BI1-Protein" meint im Rahmen der Erfindung Polypeptide die mindestens eine Sequenz die eine Homologie von bevorzugt mindestens 80%, besonders bevorzugt mindestens 90%, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, und insbesondere 100% aufweisen zu einem BI1-Konsensusmotiv ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

5

- a) H(L/I)KXVY
- b) AXGA(Y/F)XH
- c) NIGG
- d) P(V/P)(Y/F)E(E/Q)(R/Q)KR
- 10 e) (E/Q)G(A/S)S(V/I)GPL
- f) DP(S/G)(L/I)(I/L)
- g) V(G/A)T(A/S)(L/I)AF(A/G)CF(S/T)
- h) YL(Y/F)LGG, bevorzugt EYLYLGG
- i) L(L/V)SS(G/W)L(S/T)(I/M)L(L/M)W
- 15 j) DTGX(I/V)(I/V)E

10

15

[0112] Besonders bevorzugt ist dabei das BI- Konsensusmotiv h) YL(Y/F)LGG, ganz besonders bevorzugt (EYLYLGG). Dieses Motiv ist charakteristisch für pflanzliche BI1-Proteine. Besonders bevorzugt kommen Sequenzen mit Homologie zu mindestens 2 oder 3 dieser Motive (a bis j) in einem BI1-Protein vor, ganz besonders bevorzugt mindestens 4 oder 5, am meisten bevorzugt alle Motive a bis j. Weitere BI1 typischen Sequenzmotive kann der Fachmann unschwer aus dem Sequenzvergleich von BI1-Proteine - wie in FIG. 1 oder 6 dargestellt - ableiten.

20

[0113] Insbesondere bevorzugt für die Verwendung in den hierin offenbarten Verfahren sind BI1-Proteine, die kodiert werden durch ein Polypeptid das mindestens eine Sequenz umfaßt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

25

- (a) den Sequenzen gemäß SEQ ID NO 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, oder 38 ; und
- (b) Sequenzen, die eine Identität von mindestens 70%, bevorzugter 80%, 85% oder 90%, insbesondere bevorzugt 95, 97 oder 99% oder mehr zu einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, oder 38 aufweisen.

30

[0114] Von dem Begriff BI-Protein umfasst sind insbesondere natürliche oder künstliche Mutationen der BI1-Polypeptide gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, und insbesondere 38 sowie homologe bzw. ähnliche Polypeptide aus anderen Organismen, bevorzugt Pflanzen, welche weiterhin im wesentlichen gleiche Eigenschaften aufweisen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Aminosäurereste.

35

[0115] Umfaßt sind insofern auch Ausführungsformen unter Verwendung von BI1-Proteinen aus nicht-pflanzlichen Organismen wie beispielsweise Mensch (GenBank Acc.-No.: P55061), Ratte (GenBank Acc.-No.: P55062) oder Drosophila (GenBank Acc.-No.: Q9VSH3). Zwischen pflanzlichen und nicht-pflanzlichen BI1-Proteinen konservierte Motive können durch Sequenzvergleiche leicht identifiziert werden (vgl. Alignment in Bolduc N. et al., Planta 216, 377 (2003); Fig. 1 und 6).

40

[0116] Somit werden beispielsweise auch solche Polypeptide durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation eines Polypeptides gemäß SEQ ID NO 2, 4, 6, 8, 10 und 38 erhält.

[0117] Die offenbarten BI1-Sequenzen homologen Sequenzen aus anderen Pflanzen können z.B. durch

45

- (a) Datenbanksuche in Banken von Organismen, deren genomische oder cDNA Sequenz ganz oder teilweise bekannt ist, unter Verwendung der bereitgestellten BI1-Sequenzen als Suchsequenz oder
- (b) Durchmustern von Gen- oder cDNA-Bibliotheken unter Verwendung der bereitgestellten BI1-Sequenzen als Sonde -

50

aufgefunden werden. Die Durchmusterung von cDNA- oder genomischen Bibliotheken (beispielsweise unter Verwendung einer der unter SEQ ID NO 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, und 37 beschriebene Nukleinsäuresequenzen oder Teilen derselben als Sonde), ist ein dem Fachmann geläufiges Verfahren, um homologe bzw. ähnliche oder identische Sequenzen zu identifizieren. Dabei haben die von den Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID NO 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, , und 37 abgeleiteten Sonden eine Länge von mindestens 20 bp, bevorzugt mindestens 50 bp, besonders bevorzugt mindestens 100 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 200 bp, am meisten bevorzugt mindestens 400 bp. Für die Durchmusterung der Bibliotheken kann auch ein zu den unter SEQ ID NO 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, und 37 beschriebenen Sequenzen komplementärer DNA-Strang eingesetzt werden.

55

[0118] Unter Homologie zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen wird hierin die Identität der Nukleinsäuresequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge verstanden, welche wiederum durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgo-

EP 2 081 954 B1

rithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA; Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25, 3389 (1997)) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

5

Gap Weight: 50 Length Weight: 3
Average Match: 10 Average Mismatch: 0

[0119] Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 80 % auf Nukleinsäurebasis mit der Sequenz SEQ ID NO 1 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO 1 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.

10

[0120] Unter Homologie zwischen zwei Polypeptiden wird die Identität der Aminosäuresequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

15

Gap Weight: 8 Length Weight: 2
Average Match: 2,912 Average Mismatch:-2,003

[0121] Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 80 % auf Proteinbasis mit der Sequenz SEQ ID NO 2 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO 2 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.

20

[0122] BI1-Proteine umfassen auch solche Polypeptide die durch Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, die unter Standardbedingungen mit einer der durch SEQ ID NO 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, und 37 beschriebenen BI1 Nukleinsäuresequenz, der zu ihr komplementären Nukleinsäuresequenz oder Teilen der vorgenannten hybridisieren und die gleichen wesentlichen Eigenschaften wie die unter SEQ ID NO 2, 4, 6, 8, 10, und 38 beschriebenen Proteine haben.

25

[0123] Der Begriff "Standardhybridisierungsbedingungen" ist breit zu verstehen und meint stringente als auch weniger stringente Hybridisierungsbedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind unter anderem bei Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. et al., in Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. beschrieben. Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrives ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit ungefähr 2X SSC bei 50°C) und solchen mit hoher Stringenz (mit ungefähr 0.2X SSC bei 50°C bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3M Natriumcitrat, 3M NaCl, pH 7.0). Darüber hinaus kann die Temperatur während des Waschschrives von niedrig stringenten Bedingungen bei Raumtemperatur, ungefähr 22°C, bis zu stärker stringenten Bedingungen bei ungefähr 65°C angehoben werden. Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50% Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt.

30

35

[0124] "Wesentliche Eigenschaften" meint in Bezug auf ein BI-Protein eine oder mehrere nachfolgender Eigenschaften:

40

(a) Verleihung oder Steigerung der Pathogenresistenz gegen zumindest ein Pathogen bei Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion des besagten BI-Proteins in mindestens einem Gewebe der Pflanze, vorzugsweise zumindest in der Epidermis der Pflanze.

45

(b) Ausbleiben eines spontan-induzierten Zelltodes bei Erhöhung der Proteinmenge oder Funktion des besagten BI-Proteins.

(c) Die Eigenschaft bei transienter co-Transfektion von Bax mit besagtem BI1-Protein beispielsweise in HEK293 Zellen die BAX-induzierte Apoptose signifikant zu inhibieren. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Bolduc N. et al., Planta 216, 377 (2003)).

50

(d) Das Vorliegen von fünf bis sieben putativen Transmembrandomänen innerhalb des besagten BI1-Proteins.

(e) Eine präferentielle Lokalisation in Zellmembranen, insbesondere der Kernhüll-, ER- und/oder Thylakoidmembran.

[0125] Dabei kann die quantitative Ausprägung besagter Eigenschaften eines BI1-Proteins nach unten als auch nach oben im Vergleich zu einem Wert erhalten für das BI1-Protein gemäß SEQ ID NO 2, 4, 6, 8, 10, oder 38 abweichen.

55

[0126] Der Begriff "Erhöhung der BI1 Proteinmenge oder Funktion" ist breit zu verstehen und kann auf unterschiedlichen zellbiologischen Mechanismen beruhen.

[0127] "Proteinmenge" meint die Menge eines BI1-Proteins in dem jeweils angegebenen Organismus, Gewebe, Zelle

oder Zellkompartiment.

[0128] "Erhöhung der Proteinmenge" meint die mengenmäßige Erhöhung der Menge eines BI1-Proteins in dem jeweils angegebenen Organismus, Gewebe, Zelle oder Zellkompartiment - beispielsweise durch eines der unten beschriebenen Verfahren - im Vergleich zu dem Wildtyp derselben Gattung und Art auf den dieses Verfahren nicht angewendet wurde, aber unter ansonsten im wesentlichen gleichen Rahmenbedingungen (wie beispielsweise Kulturbedingungen, Alter der Pflanzen etc.). Die Erhöhung beträgt dabei mindestens 10 %, bevorzugt mindestens 30 % oder mindestens 50 %, besonders bevorzugt mindestens 70 % oder 100 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 200 % oder 500 %, am meisten bevorzugt um mindestens 1000 %. Die Bestimmung der Proteinmenge kann durch verschiedene dem Fachmann geläufige Verfahren erfolgen. Beispielfhaft, jedoch nicht einschränkend, sind zu nennen: Das Mikro-Biuret Verfahren (Goa J., Scand J. Clin. Lab. Invest. 5, 218 (1953)), die Folin-Ciocalteu-Methode (Lowry O.H. et al., J Biol Chem 193, 265 (1951)) oder die Messung der Adsorption von CBB G-250 (Bradford M.M., Analyt.Biochem. 72, 248 (1976)). Ferner kann eine Quantifizierung über immunologische Methoden wie beispielsweise Western-Blot erfolgen. Die Herstellung entsprechender BI1-Antikörper sowie die Durchführung von BI1-Western-Blots ist beschrieben (Bolduc N. et al., FEBS Lett 532, 111 (2002)). Eine indirekte Quantifizierung kann über Northern-Blots realisiert werden, wobei die mRNA Menge in der Regel gut mit der resultierenden Proteinmenge korreliert. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (u.a. Bolduc N. et al., Planta 216, 377 (2003); Matsumura H. et al., Plant J. 33,425 (2003)).

[0129] "Funktion" meint bevorzugt die Eigenschaft eines BI1-Proteins den spontan-induzierten Zelltodes zu vermindern und/oder die Eigenschaft, die apoptose-induzierende Wirkung von Bax zu inhibieren. Entsprechende Funktionen zählen zu den wesentlichen Eigenschaft eines BI1-Proteins.

[0130] "Erhöhung" der Funktion meint beispielsweise die mengenmäßige Steigerung der inhibitorischen Wirkung auf den Bax-induzierten apoptotischen Zelltod, welche durch dem Fachmann geläufige Verfahren quantifiziert werden kann (s.o.) Der Erhöhung beträgt dabei mindestens 10 %, bevorzugt mindestens 30 % oder mindestens 50 %, besonders bevorzugt mindestens 70 % oder 100 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 200 % oder 500 %, am meisten bevorzugt um mindestens 1000 %. Verfahren zur Erhöhung der Funktion umfassen neben den oben beschriebenen Verfahren zur Erhöhung der Proteinmenge (die in der Regel auch die Funktion erhöht) ferner beispielhaft - jedoch nicht einschränkend - insbesondere das Einführen von Mutationen in ein BI1-Protein oder Inhibierung eines putativen Inhibitors von BI1 etc.

[0131] Die BI1-Proteinmenge kann beispielsweise, jedoch nicht einschränkend, durch nachfolgenden Verfahren erhöht werden:

[0132] Rekombinante Expression oder Überexpression eines BI1-Proteins durch Einbringen einer rekombinanten Expressionskassette umfassend eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein BI1-Protein unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors, wobei besagter Promotor bevorzugt im wesentlichen spezifisch in der Blattepidermis Aktivität aufweist, und/oder keine Aktivität im Mesophyll aufweist.

[0133] Der Begriff "Einbringen" umfaßt allgemein alle Verfahren, die dazu geeignet sind, die einzubringende Verbindung, direkt oder indirekt, in eine Pflanze oder eine Zelle, Kompartiment, Gewebe, Organ oder Samen derselben einzuführen oder dort zu generieren. Direkte und indirekte Verfahren sind umfaßt. Das Einbringen kann zu einer vorübergehenden (transienten) Präsenz besagter Verbindung führen oder aber auch zu einer dauerhaften (stabilen) oder induzierbaren. Einführen umfaßt beispielsweise Verfahren wie Transfektion, Transduktion oder Transformation.

[0134] In den zum Einsatz kommenden rekombinanten Expressionskassetten steht ein Nukleinsäuremolekül (beispielsweise kodierend für ein BI1-Protein) in funktioneller Verknüpfung mit mindestens einem gewebespezifischen Promotor, wobei besagter Promotor bevorzugt im wesentlichen spezifisch in der Blattepidermis Aktivität aufweist, und/oder keine Aktivität im Mesophyll aufweist und wobei der Promotor in Bezug auf die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz heterolog ist d.h. natürlicherweise nicht mit derselben kombiniert vorkommt. Die rekombinanten Expressionskassetten können optional weitere genetische Kontrollelemente umfassen.

[0135] Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung des besagten Promotors mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der rekombinanten Expression der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die rekombinant zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter der als Promoter fungierenden Sequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der rekombinant zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare. Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung als auch die Herstellung einer rekombinanten Expressionskassette kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie oben beschrieben sind. Zwischen beide Sequenzen können aber auch weitere Sequenzen positioniert werden, die zum Beispiel die Funktion eines Linkers mit bestimmten Restriktionsenzymststellen oder eines Signalpeptides haben. Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expres-

sion von Fusionsproteinen führen.

[0136] Bevorzugt kann die rekombinante Expressionskassette, bestehend aus einer Verknüpfung von Promoter und zu exprimierender Nukleinsäuresequenz, integriert in einem Vektor vorliegen und durch zum Beispiel Transformation in ein pflanzliches Genom inseriert werden.

[0137] Unter einer rekombinanten Expressionskassette sind aber auch solche Konstruktionen zu verstehen, bei denen der Promoter - zum Beispiel durch eine homologe Rekombination - vor ein endogenes BI1-Gen plaziert wird, und so die Expression des BI1-Proteins steuert. Analog kann auch die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz (z.B. kodierend für ein BI1-Protein) derart hinter einen endogenen Promotor plaziert werden, dass der gleiche Effekt auftritt. Beide Ansätze führen zu rekombinanten Expressionskassetten im Sinne der Erfindung.

[0138] Unter einem "gewebespezifischen Promotor, der im wesentlichen spezifisch in der Blattepidermis Aktivität aufweist" sind allgemein solche Promotoren zu verstehen, die geeignet sind, eine rekombinante Expression einer Nukleinsäuresequenz mindestens in einem pflanzlichen Gewebe zu gewährleisten oder zu erhöhen, mit der Maßgabe, dass

(a) die Expression mindestens in der Epidermis stattfindet, und bevorzugt nicht im Mesophyll bzw. im Mesophyll im Wesentlichen unverändert bleibt, wobei andere als diese beiden Gewebe außer Betracht bleiben, und

(b) die rekombinante Expression unter Kontrolle des besagten Promotors in besagtem pflanzlichen Gewebe mindestens das fünffache, bevorzugt mindestens das zehnfache, besonders bevorzugt mindestens das einhundertfache der Expression gegenüber einer Vergleichspflanze beträgt.

[0139] Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Regionen, Introns oder nichtkodierende 3'-Region von Genen wie beispielsweise das Actin-1 Intron, oder die Adh1-S Introns 1, 2 und 6 (allgemein: The Maize Handbook, Chapter 116, Freeling and Walbot, Eds., Springer, New York (1994)). Es ist gezeigt worden, dass diese eine signifikante Funktionen bei der Regulation der Genexpression spielen können. So wurde gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente Expression heterologer Gene verstärken können. Beispielhaft für Translationsverstärker sei die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus zu nennen (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15, 8693 (1987)) und dergleichen. Sie können ferner die Gewebsspezifität fördern (Rouster J. et al., Plant J 15, 435 (1998)).

[0140] Die rekombinante Expressionskassette kann vorteilhafterweise eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promoter enthalten, die eine erhöhte rekombinante Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der rekombinanten zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die rekombinanten zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

[0141] Als Kontrollsequenzen geeignete Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator und der NOS (Nopalinsynthase)-Terminator.

[0142] Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom erlauben. Bei der homologen Rekombination kann zum Beispiel der natürliche Promoter eines BI1-Gens gegen einen der bevorzugten gewebespezifischen Promoter ausgetauscht werden. Methoden wie die cre/lox-Technologie erlauben eine gewebespezifische, unter Umständen induzierbare Entfernung der rekombinanten Expressionskassette aus dem Genom des Wirtsorganismus (Sauer B., Methods. 14(4), 381(1998)). Hier werden bestimmte flankierende Sequenzen dem Zielgen angefügt (lox-Sequenzen), die später eine Entfernung mittels der cre-Rekombinase ermöglichen.

[0143] Eine rekombinante Expressionskassette und die von ihr abgeleiteten Vektoren können weitere Funktionselemente enthalten. Der Begriff Funktionselement ist breit zu verstehen und meint all solche Elemente, die einen Einfluß auf Herstellung, Vermehrung oder Funktion der erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassetten, Vektoren oder rekombinanten Organismen haben. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen:

(a) Selektionsmarker, die eine Resistenz gegen einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxy-glucose-6-phosphat (WO 98/45456), Antibiotika oder Biozide, bevorzugt Herbizide, wie zum Beispiel Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin, oder Phosphinotricin etc. verleihen. Besonders bevorzugte Selektionsmarker sind solche die eine Resistenz gegen Herbizide verleihen. Beispielhaft seien genannt: DNA Sequenzen, die für Phosphinotricinacetyltransferasen (PAT) kodieren und Glutaminsynthaseinhibitoren inaktivieren (bar und pat Gen), 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthasegene (EPSP Synthasegene), die eine Resistenz gegen Glyphosat® (N-(Phosphonomethyl)glycin) verleihen, das für das Glyphosat® degradierende Enzyme kodierende gox Gen (Glyphosatoxidoreduktase), das deh Gen (kodierend für eine Dehalogenase, die Dalapon® inaktiviert) sowie bxn Gene, die für Bromoxynil degradierende Nitrilaseenzyme kodieren, das aasa-Gen, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Apectinomycin verleiht, das Streptomycinphosphotransferase (SPT) Gen, das eine Resistenz gegen Streptomycin gewährt, das Neomycinphosphotransferase (NPTII) Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin oder Geneticidin verleiht, das Hygromycinphosphotransferase (HPT) Gen, das eine Resistenz gegen Hygromycin vermittelt, das Acetolactat-

synthas Gen (ALS), das eine Resistenz gegen SulfonylharnstoffHerbizide verleiht (z.B. mutierte ALS-Varianten mit z.B. der S4 und/oder Hra Mutation), sowie das Acetolactatsynthase-Gen (ALS), das eine Resistenz gegen Imidazolinon-Herbizide verleiht.

5 (b) Reportergene, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren und über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressionsortes oder -zeitpunktes gewährleisten. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E., Groskreutz D., Mol. Biotechnol. 13(1), 29(1999)) wie das "green fluorescent protein" (GFP) (Sheen et al., Plant Journal 8(5), 777 (1995); Haseloff et al., Proc. Natl. Acad.Sci.USA 94(6), 2122 (1997); Reichel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(12), 5888 (1996); Tian et al., Plant Cell Rep. 16, 267 (1997); WO 97/41228; Chui W.L. et al., Curr. Biol. 6, 325 (1996); Leffel S.M. et al., Biotechniques 23(5), 912 (1997)), die Chloramphenicoltransferase, eine Luziferase (Ow et al., Science 234, 856 (1986); Millar et al., Plant Mol. Biol. Rep. 10, 324 (1992)), das Aequorin (Prasher et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 126 (3), 1259 (1985)), die β -Galactosidase, R-Locus Gen (kodieren ein Protein, das die Produktion von Anthocyanin-pigmenten (rote Färbung) in pflanzlichen Gewebe reguliert und so eine direkte Analyse der Promotoraktivität ohne Zugabe zusätzlicher Hilfstoffe oder chromogener Substrate ermöglicht; Dellaporta et al. in Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts, 18th Stadler Genetics Symposium, 11 (1988)), ganz besonders bevorzugt ist die β -Glucuronidase (Jefferson et al., EMBO J. 6, 3901 (1987)).

20 (c) Replikationsursprünge, die eine Vermehrung der erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionskassetten oder Vektoren in zum Beispiel E.coli gewährleisten. Beispielhaft seien genannt ORI (origin of DNA replication), der pBR322 ori oder der P15A ori (Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

25 (d) Elemente, die für eine Agrobacterium vermittelte Pflanzentransformation erforderlich sind, wie zum Beispiel die rechte oder linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.

30 **[0144]** Zur Selektion erfolgreich homolog rekombinierter oder auch transformierter Zellen ist es in der Regel erforderlich, einen selektionierbaren Marker zusätzlich einzuführen, der den erfolgreich rekombinierten Zellen eine Resistenz gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Herbizid), einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder ein Antibiotikum verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion der transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al., Plant Cell Reports 5, 81 (1986)).

35 **[0145]** Die Einführung einer rekombinanten Expressionskassette in einen Organismus oder Zellen, Geweben, Organe, Teile bzw. Samen desselben (bevorzugt in Pflanzen bzw. pflanzliche Zellen, Gewebe, Organe, Teile oder Samen), kann vorteilhaft unter Verwendung von Vektoren realisiert werden, in denen die rekombinanten Expressionskassetten enthalten sind. Die rekombinante Expressionskassette kann in den Vektor (zum Beispiel ein Plasmid) über eine geeignete Restriktionsschnittstelle eingeführt werden. Das entstandene Plasmid wird zunächst in E.coli eingeführt. Korrekt transformierte E.coli werden selektioniert, gezüchtet und das rekombinante Plasmid mit dem Fachmann geläufigen Methoden gewonnen. Restriktionsanalyse und Sequenzierung können dazu dienen, den Klonierungsschritt zu überprüfen.

40 **[0146]** Vektoren können beispielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren oder auch Agrobacterien sein. Es wird die Einführung der rekombinante Expressionskassette mittels Plasmidvektoren beschrieben. Bevorzugt sind solche Vektoren, die eine stabile Integration der rekombinanten Expressionskassette in das Wirtsgenom ermöglichen.

[0147] Die Herstellung eines transformierten Organismus (bzw. einer transformierten Zelle oder Gewebes) erfordert, dass die entsprechende DNA, RNA oder Protein in die entsprechende Wirtszelle eingebracht wird.

45 **[0148]** Für diesen Vorgang, der als Transformation (oder Transduktion bzw. Transfektion) bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (Keown et al., Methods Enzymol. 185, 527 (1990); Jenes B. et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von Kung S.D. und Wu R., Academic Press, S. 128-143 (1993), sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42, 205 (1991)).

50 **[0149]** So kann die DNA oder RNA beispielhaft direkt durch Mikroinjektion oder durch Bombardierung mit DNA-beschichteten Mikropartikeln eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch, zum Beispiel mit Polyethylenglykol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die DNA kann auch durch Protoplastenfusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder Liposomen erfolgen. Elektroporation ist eine weitere geeignete Methode zur Einführung von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert werden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (beispielsweise bei Bilanz et al., Gene 100, 247 (1991); Scheid et al., Mol. Gen. Genet. 228, 104 (1991); Guerche et al., Plant Science 52, 111 (1987); Neuhauser et al., Theor. Appl. Genet. 75, 30 (1987); Klein et al., Nature 327, 70 (1987); Howell et al., Science 208, 1265 (1980); Horsch et al., Science 227, 1229 (1985); DeBlock et al., Plant Physiol 91, 694 (1989)).

55 **[0150]** Bei Pflanzen werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind vor allem die

Protoplastentransformation durch Polyethylenglykolinduzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone, die sogenannte "particle bombardment" Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNAhaltiger Lösung und die Mikroinjektion.

[0151] Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Transformation auch durch bakterielle Infektion mittels *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* durchgeführt werden. Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation ist am besten für dicotyledone Pflanzenzellen geeignet. Die Verfahren sind beispielsweise beschrieben bei Horsch R.B. et al., *Science* 225, 1229 (1985).

[0152] Werden *Agrobacterien* verwendet, so ist die rekombinante Expressionskassette in spezielle Plasmide zu integrieren, entweder in einen Zwischenvektor (englisch: shuttle or intermediate vector) oder einen binären Vektor. Wird ein Ti oder Ri Plasmid zur Transformation verwendet werden soll, ist zumindest die rechte Begrenzung, meistens jedoch die rechte und die linke Begrenzung der Ti oder Ri Plasmid T-DNA als flankierende Region mit der einzuführenden rekombinanten Expressionskassette verbunden.

[0153] Bevorzugt werden binäre Vektoren verwendet. Binäre Vektoren können sowohl in *E.coli* als auch in *Agrobacterium* replizieren. Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen und einen Linker oder Polylinker flankiert von der rechten und linken T-DNA Begrenzungssequenz. Sie können direkt in *Agrobacterium* transformiert werden (Holsters et al., *Mol. Gen. Genet.* 163, 181 (1978)). Das Selektionsmarkergen erlaubt eine Selektion transformierter *Agrobacteria* und ist zum Beispiel das nptII Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin verleiht. Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende *Agrobacterium* sollte bereits ein Plasmid mit der vir-Region enthalten. Diese ist für die Übertragung der T-DNA auf die pflanzliche Zelle erforderlich. Ein so transformiertes *Agrobacterium* kann zur Transformation pflanzlicher Zellen verwendet werden. Die Verwendung von T-DNA zur Transformation pflanzlicher Zellen ist intensiv untersucht und beschrieben (EP 120 516; Hoekemain: *The Binary Plant Vector System*, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasserdam, Chapter V; An et al., *EMBO J.* 4, 277 (1985)). Verschiedene binäre Vektoren sind bekannt und teilweise kommerziell erhältlich wie zum Beispiel pBI101.2 oder pBIN19 (Bevan et al., *Nucl. Acids Res.* 12, 8711(1984) ; Clontech Laboratories, Inc. USA). Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind beschrieben (Rogers et al., *Methods Enzymol.* 153, 253 (1987); Schardl et al., *Gene* 61, 1 (1987); Berger et al., *Proc. Natl. A-cad. Sci. USA* 86, 8402 (1989)).

[0154] Direkte Transformationstechniken eignen sich im Prinzip für jeden Organismus und Zelltyp. Im Falle von Injektion oder Elektroporation von DNA bzw. RNA in pflanzliche Zellen sind keine besonderen Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache Plasmide wie die der pUC-Reihe können verwendet werden. Sollen vollständige Pflanzen aus den transformierten Zellen regeneriert werden, so ist es erforderlich, dass sich auf dem Plasmid ein zusätzliches selektionierbares Markergen befindet.

[0155] Stabil transformierte Zellen d.h. solche, die die eingeführte DNA integriert in die DNA der Wirtszelle enthalten, können von untransformierten selektioniert werden, beispielsweise wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Als Marker kann beispielhaft jedes Gen fungieren, das eine Resistenz gegen Antibiotika oder Herbizide (wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin etc.) zu verleihen vermag (s.o.). Transformierte Zellen, die ein solches Markergen exprimieren, sind in der Lage, in der Gegenwart von Konzentrationen eines entsprechenden Antibiotikums oder Herbizides zu überleben, die einen untransformierten Wildtyp abtöten. Beispiel für geeignete Selektionsmarker sind oben genannt. Sobald eine transformierte Pflanzenzelle hergestellt wurde, kann eine vollständige Pflanze unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft von Kalluskulturen aus. Aus diesen noch undifferenzierten Zellmassen kann die Bildung von Sproß und Wurzel in bekannter Weise induziert werden. Die erhaltenen Sprößlinge können ausgepflanzt und gezüchtet werden. Dem Fachmann sind Verfahren bekannt, um aus Pflanzenzellen, Pflanzenteile und ganze Pflanzen zu regenerieren. Beispielsweise werden hierzu Verfahren beschrieben von Fennell et al., *Plant Cell Rep.* 11, 567 (1992); Stoeger et al., *Plant Cell Rep.* 14, 273 (1995); Jahne et al., *Theor. Appl. Genet.* 89, 525 (1994) verwendet. Die erhaltenen Pflanzen können in der üblichen Weise gezüchtet und/oder gekreuzt werden. Zwei oder mehr Generationen sollten kultiviert werden, um sicherzustellen, dass die genomische Integration stabil und vererblich ist.

[0156] Das beschriebene Verfahren kann vorteilhaft mit weiteren Verfahren die eine Pathogenresistenz (beispielsweise gegen Insekten, Pilze, Bakterien, Nematoden etc.), Streßresistenz oder eine andere Verbesserung der pflanzlichen Eigenschaften bewirken kombiniert werden. Beispiele sind u.a. genannt bei Dunwell J.M., *J. Exp. Bot.* 51 (Spec No), 487 (2000).

[0157] "Rekombinant" meint bezüglich zum Beispiel einer Nukleinsäuresequenz, einer Expressionskassette oder einem Vektor enthaltend besagte Nukleinsäuresequenz oder einem Organismus transformiert mit besagter Nukleinsäuresequenz, Expressionskassette oder Vektor alle solche durch gentechnische Methoden zustandegekommene Konstruktionen, in denen sich entweder

(a) die B11 Nukleinsäuresequenz, oder

(b) eine mit der B11 Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz, zum Beispiel ein Promotor, oder

(c) (a) und (b)

sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft eine Substitution, Addition, Deletion, Inversion oder Insertion eines oder mehrerer Nukleotidreste sein kann. Natürliche genetische Umgebung meint den natürlichen chromosomalen Locus in dem Herkunftorganismus oder das Vorliegen in einer genomischen Bibliothek. Im Fall einer genomischen Bibliothek ist die natürliche, genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch teilweise erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an einer Seite und hat eine Sequenzlänge von mindestens 50 bp, bevorzugt mindestens 500 bp, besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 5000 bp. Eine natürlich vorkommende Expressionskassette - beispielsweise die natürlich vorkommende Kombination des B11-Promotors mit dem entsprechenden B11-Gen - wird zu einer rekombinanten Expressionskassette, wenn diese durch nicht-natürliche, synthetische ("künstliche") Verfahren wie beispielsweise einer Mutagenisierung geändert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (US 5,565,350; WO 00/15815; siehe auch oben).

[0158] Ein anderer Gegenstand betrifft rekombinante Organismen, transformiert mit wenigstens einer Nukleinsäuresequenzen, Expressionskassette oder einem Vektor, sowie Zellen, Zellkulturen, Gewebe, Teile - wie zum Beispiel bei pflanzlichen Organismen Blätter, Wurzeln usw. - oder Vermehrungsgut abgeleitet von solchen Organismen. Organismus ist breit zu verstehen und meint prokaryotische und eukaryotische Organismen, bevorzugt Bakterien, Hefen, Pilze, tierische und pflanzliche Organismen. Als rekombinante Organismen bevorzugte Wirts- oder Ausgangsorganismen sind vor allem Pflanzen gemäß der oben genannten Definition.

[0159] Ein weiterer Gegenstand betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen, rekombinanten Organismen und der von ihnen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile - wie zum Beispiel bei rekombinanten pflanzlichen Organismen Wurzeln, Blätter etc.-, und rekombinantes Vermehrungsgut wie Saaten oder Früchte, zur Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

[0160] Weiterhin wird ein Nukleinsäuremolekül, das antisense zu der Nukleinsäure ist, ein monoclonaler, spezifisch an das Polypeptide bindender Antikörper und ein Fungizid, das die Nukleinsäure, den Vektor, insbesondere einen infektiösen, z.B. viralen Vektor, das erfindungsgemäße Polypeptide in einer zur Auftragung auf Pflanzen geeigneten Form enthält, z.B. verkapselt oder in einem infektiösen, vorzugsweise zur Übertragung von Nukleinsäuren oder Expression von Genen in einer Zelle geeigneten Organismus, wie ein Agrobacterium oder ein Virus.

[0161] Weiterhin beschrieben ist die Verwendung eines BI-1 codierenden Nukleinsäuremoleküls oder eines BI-1 Proteins zur Herstellung einer Pathogen-resistenten Pflanze, vorzugsweise zur Herstellung einer gegen Pilze resistenten Pflanze oder zur Herstellung eines dies bewirkenden Fungizids oder zur Bekämpfung oder Behandlung von mit Pathogenen befallenen oder durch Pathogene bedrohten Pflanzen.

Sequenzen

[0162]

1. SEQ ID NO: 1 : Nukleinsäuresequenz kodierend für ein B11 Protein aus Gerste (*Hordeum vulgare*).
2. SEQ ID NO: 2 : Aminosäuresequenz kodierend für ein B11 Protein aus Gerste (*Hordeum vulgare*).
3. SEQ ID NO: 3 : Nukleinsäuresequenz kodierend für ein B11 Protein aus *Arabidopsis thaliana*.
4. SEQ ID NO: 4 : Aminosäuresequenz kodierend für ein B11 Protein aus *Arabidopsis thaliana*.
5. SEQ ID NO: 5 : Nukleinsäuresequenz kodierend für ein B11 Protein aus Tabak.
6. SEQ ID NO: 6 : Aminosäuresequenz kodierend für ein B11 Protein aus Tabak.
7. SEQ ID NO: 7 : Nukleinsäuresequenz kodierend für ein B11 Protein aus Reis.
8. SEQ ID NO: 8 : Aminosäuresequenz kodierend für ein B11 Protein aus Reis.
9. SEQ ID NO: 9 : Nukleinsäuresequenz kodierend für ein B11 Protein aus Raps.
10. SEQ ID NO: 10 : Aminosäuresequenz kodierend für ein B11 Protein aus Raps.
11. SEQ ID NO: 11 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teileines B11 Protein aus Soja.
12. SEQ ID NO: 12 : Aminosäuresequenz kodierend für Teileines B11 Protein aus Soja.

EP 2 081 954 B1

13. SEQ ID NO: 13 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teileines BI1 Protein aus Soja.
14. SEQ ID NO: 14: Aminosäuresequenz kodierend für Teileines BI1 Protein aus Soja.
- 5 15. SEQ ID NO: 15 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Weizen.
16. SEQ ID NO: 16 : Aminosäuresequenz kodierend für Teileines BI1 Protein aus Weizen.
17. SEQ ID NO: 17 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teileines BI1 Protein aus Mais.
- 10 18. SEQ ID NO: 18 : Aminosäuresequenz kodierend für Teileines BI1 Protein aus Mais.
19. SEQ ID NO: 19 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teileines BI1 Protein aus Weizen.
- 15 20. SEQ ID NO: 20 : Aminosäuresequenz kodierend für Teileines BI1 Protein aus Weizen.
21. SEQ ID NO: 21 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Mais.
22. SEQ ID NO: 22 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Mais.
- 20 23. SEQ ID NO: 23 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Mais.
24. SEQ ID NO: 24 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Mais.
- 25 25. SEQ ID NO: 25 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Weizen.
26. SEQ ID NO: 26 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Weizen.
27. SEQ ID NO: 27 : Nukleinsäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Mais.
- 30 28. SEQ ID NO: 28 : Aminosäuresequenz kodierend für Teil eines BI1 Protein aus Mais.
29. SEQ ID NO: 29 : Nukleinsäuresequenz kodierend für den Patatin Promotor aus Kartoffel.
- 35 30. SEQ ID NO: 30 : Nukleinsäuresequenz kodierend für den Germin 9f-3.8 Promotor aus Weizen.
31. SEQ ID NO: 31 : Nukleinsäuresequenz kodierend für den Arabidopsis CAB-2 Promotor.
32. SEQ ID NO: 32 : Nukleinsäuresequenz kodierend für den PPCZm1 Promotor aus Mais.
- 40 33. SEQ ID NO: 33 : Nukleinsäuresequenz kodierend für rekombinanten Expressionsvektor pUbiBI-1.
34. SEQ ID NO: 34 : Nukleinsäuresequenz kodierend für rekombinanten Expressionsvektor pLo114UbiBI-1.
- 45 35. SEQ ID NO: 35 : Nukleinsäuresequenz kodierend für rekombinanten Expressionsvektor pOXoBI-1.
36. SEQ ID NO: 36 : Nukleinsäuresequenz kodierend für rekombinanten Expressionsvektor pLo114OXoBI-1.
37. SEQ ID NO: 37: Nukleinsäuresequenz kodierend für BI-1 Protein aus Weizen.
- 50 38. SEQ ID NO: 38: Aminosäuresequenz kodierend für BI-1 Protein aus Weizen.
39. SEQ ID NO: 39: Nukleinsäuresequenz für PEN1 (= ROR2) aus Gerste.
- 55 40. SEQ ID NO: 40: Aminosäuresequenz kodierend für PEN1 (= ROR2) aus Gerste.
41. SEQ ID NO: 41: Nukleinsäuresequenz für PEN1 (= ROR2) aus Arabidopsis thaliana.

EP 2 081 954 B1

42. SEQ ID NO: 42: Aminosäuresequenz kodierend für PEN1 (= ROR2) aus *Arabidopsis thaliana*.
43. SEQ ID NO: 43: Nukleinsäuresequenz kodierend für SNAP34 aus Gerste.
- 5 44. SEQ ID NO: 44: Aminosäuresequenz kodierend für SNAP34 aus Gerste.
45. SEQ ID NO: 45: Nukleinsäuresequenz kodierend für BI-1 aus Soja.
46. SEQ ID NO: 46: Aminosäuresequenz kodierend für BI-1 aus Soja.
- 10 47. SEQ ID NO: 47: GFP- Primer 1 (siehe unten).
48. SEQ ID NO: 48: GFP- Primer 2 (siehe unten).

15 Abbildungen:

[0163]

- 20 1. Fig. 1 a-d: Vergleich von Proteinsequenzen verschiedener BI-1 Proteine aus Pflanzen. AtBI-1: *Arabidopsis*; BnBI-1: *Brassica napus* (Raps); GmBI2: *Glycine max* (Soja; Variante 1); GmBI3: *Glycine max* (Soja; Variante 2); HvBI-1: *Hordeum vulgare* (Gerste); NtBI-1: *Nicotiana tabacum* (Tabak); OsBI-1: *Oryza sativa* (Reis); TaBI11: *Triticum aestivum* (Weizen, Variante 1); TaBI18: *Triticum aestivum* (Weizen, Variante 2); TaBI5 neu: *Triticum aestivum* (Weizen, Variante 3); ZmBI14: *Zea mays* (Mais; Variante 1); ZmBI16: *Zea mays* (Mais; Variante 2); ZmBI33: *Zea mays* (Mais; Variante 3); ZmBI8: *Zea mays* (Mais; Variante 4); Consensus: Aus dem Alignment abgeleitete Konsensussequenz.
- 25 2. Fig. 2: Vektorkarte für Vektor pUbiBI-1 (Ubi: Ubiquitin-Promotor; BI-1 Nukleinsäuresequenz kodierend für Gerste BI1-Protein; ter: Transkriptionsterminator). Angegeben sind ferner die Lokalisation der Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme.
- 30 3. Fig. 3: Vektorkarte für Vektor pLO114UbiBI-1 (Ubi: Ubiquitin-Promotor; BI-1 Nukleinsäuresequenz kodierend für Gerste BI1-Protein; ter: Transkriptionsterminator). Angegeben sind ferner die Lokalisation der Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme.
- 35 4. Fig. 4: Vektorkarte für Vektor pOxoBI-1 (Oxo: TaGermin 9f-2.8 Promotor; BI-1 Nukleinsäuresequenz kodierend für Gerste BI1-Protein; ter: Transkriptionsterminator). Angegeben sind ferner die Lokalisation der Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme.
- 40 5. Fig. 5: Vektorkarte für Vektor pLO114OxoBI-1 (Oxo: TaGermin 9f-2.8 Promotor; BI-1 Nukleinsäuresequenz kodierend für Gerste BI1-Protein; ter: Transkriptionsterminator). Angegeben sind ferner die Lokalisation der Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme.
- 45 6. Fig. 6: Vergleich der Proteinsequenzen von BI-1 Proteinen aus Gerste (*Hordeum vulgare*, GenBank Acc.-No.: CAC37797), Reis (*Oryza sativa*, GenBank Acc.-No.: Q9MBD8), *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.-No.: Q9LD45) und Mensch (*Homo sapiens*, GenBank Acc.-No.: AAB87479). Schwarzhinterlegte Aminosäuren sind identisch in allen Arten. Grau hinterlegte Aminosäuren sind nur in Pflanzen identisch. Balken zeigen die vorausgesagten sieben Transmembrandomänen in HvBI-1 an.
- 50 7. Fig. 7: Graphische Darstellung der Transformationsrate in Abhängigkeit von den Bedingungen bei der ballistischen Transformation von Soja- (A) und Gerstebältern (B). Für die Transformation wurden jeweils 1.6 µg DNA pro Schuss und für Gerstebältern Partikel mit 0.6 µm sowie für Soja mit 1 µm Durchmesser verwendet. Die Zahl der transformierten Zellen wurde 24 h nach der Transformation bestimmt.
- 55 8. Fig. 8: Graphische Darstellung der Penetrationsrate von *P. pachyrhizi* in transient mit einem BI-1 Überexpressionskonstrukt transformierten Gerstenzellen im Vergleich zur Kontrolle. Drei voneinander unabhängige Experimente liegen den Werten zugrunde. Als Kontrolle wurden Gerstebältern mit dem Reportergenkonstrukt pGY1-GFP und dem leeren Vektor transformiert. Die Penetrationsrate ist in den mit BI-1 transformierten Zellen signifikant verschieden vom WT ($P < 0.05$).

EP 2 081 954 B1

9. Fig. 9: PCR zum Nachweis des GFP-BI-1 Konstruktes in den transgenen Gerstelini-
5 E15L7P1 (T2), #6(2)E15L7P2 (T2) und #6(1)E8L1(T1) (Sorte, 'Golden Promise'). Die PCR wurde mit genomischer
DNA der Pflanzen mit den GFP-spezifischen Primern durchgeführt. In positiven transgenen Pflanzen wird das
vollständige GFP mit 740 bp amplifiziert. Als Negativkontrolle diente genomische DNA aus dem WT 'Golden Promise'
(WT) oder Wasser (NTC). Als Positiv-Kontrolle (PK) wurde das GFP vom Plasmid pGY1-GFP amplifiziert.

10. Fig. 10: Ermittelte Daten zur Penetrationsrate von *P. pachyrhizi* in transient mit einem BI-1 Überexpressions-
10 konstrukt transformierten Gerstenzellen. Gezeigt sind die Fig. 8 zugrundeliegenden Daten (siehe auch unten Bei-
spiele).

11. Fig. 11 A/B: Ausgezählte Sporen und Zellreaktionen bei der Interaktion zwischen Sojarost und transgenen
15 Gerstelini- mit dem GFP-BI-1 Überexpressionskonstrukt #6(1)E4L3P5(T2), 1#6(2)E15L7P1(T2), #6(2)E15L7P2
(T2) und #6(1)E8L1(T1) der Sorte 'Golden Promise'. Als Kontrolle diente der WT. Blätter von 7 d alten Pflanzen
wurden mit Sojarost inokuliert nach 24 h fixiert und für das Auszählen mit Anillinblau gefärbt.

12. Fig. 12: Relativer Anteil der Papillenbildung und der HR nach der Inokulation mit *P. pachyrhizi* in Gerstenblättern
20 von den transgenen Linien (Sorte 'Golden Promise') #6(1)E4L3P5 (T2), 1#6(2)E15L7P1 (T2), #6(2)E15L7P2 (T2)
und #6(1)E8L1(T1) im Vergleich zum WT. Die Primärblätter wurden sieben Tage nach der Aussaat der Gerstesamen
abgenommen, mit *P. pachyrhizi* inokuliert und 24 h nach der Inokulation ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte
des WT und der einzelnen Linien. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die relative Papillenbildung
und die HR sind in den transgenen Linien nach einem studentschen Test gegenüber dem WT signifikant verschieden
P < 0.001.

Beispiele

Allgemeine Methoden:

30 **[0164]** Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phospho-
amiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die im Rahmen der vorliegenden
Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarosegelelektrophorese, Reinigung
von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-
Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse
35 rekombinanter DNA werden wie bei Sambrook et al. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), ISBN 0-87969-309-6;
beschrieben durchgeführt. Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgt mit einem Laserfluoreszenz-DNA-
Sequenzierer der Firma MWG-Licor nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463
(1977)).

Beispiel 1 : Inokulation mit *P. pachyrhizi*

40 **[0165]** Geeignetes Sporenmaterial (Uredosporen) des Erregers *Phakopsora pachyrhizi* stammt von BASF Aktienge-
sellschaft. Dafür wurden Sporen von 2-3 Wochen zuvor inokulierten Sojapflanzen direkt verwendet oder auf Alufolie
abgeklopft und auf einem Trockenmittel (TROPAGel, Tropack, Lahnau) im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert.

45 **[0166]** Für die Herstellung einer Sporensuspension wurden die Sporen von den Blättern in Tween-H₂O (0,1 %) ab-
gewaschen. Das Auszählen der Sporen erfolgte mittels einer Thoma-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop. Für die
Inokulation wurden die Blätter auf 1 % H₂O-Agar mit einem Metallring fixiert. Zur Inokulation wurden schließlich ver-
schiedene Methoden verwendet: Für die Sprühinokulation wurde die Sporensuspension in eine mit Druckluft betriebene
Sprühflasche gegeben und gleichmäßig auf den Pflanzen verteilt bis die Blattoberfläche gut befeuchtet war. Um eine
höhere Sporendichte zu erreichen, wurden außerdem Blätter, nachdem sie zuvor mit Tween-H₂O eingesprüht worden
waren, in einem 'Fallturm' trocken inokuliert. Hierzu wird der Turm über die Platten mit den angefeuchteten Blättern
50 gestellt. Die jungen Sporen von infizierten Sojapflanzen werden durch eine Öffnungsklappe in den Turm geblasen. Durch
den Luftzug werden die Sporen verwirbelt, fein verteilt und fallen auf die Blätter.

55 **[0167]** Um höhere Inokulationsdichten ohne Aggregation der Sporen zu erreichen, wurden die Blätter alternativ mit
einer Sporensuspension überschichtet und nach 15 min aus der Suspension entnommen (Überschichtungsmethode).
Nach dieser Zeit war bereits eine ausreichende Anheftung der präzipitierten Sporen gegeben. Die Inkubation der inoku-
lierten Blätter erfolgte in einer Kammer mit durchschnittlich 25 °C und 71,2 % Luftfeuchtigkeit.

[0168] Um den Infektionsverlauf mikroskopisch zu beurteilen, wurden 0 hours post inokulation (hpi), 6 hpi, 24 hpi und
48 hpi Blattproben genommen und mit verschiedenen Methoden eingefärbt.

EP 2 081 954 B1

a) Coomassie-Färbung

[0169] Zur Coomassie-Färbung wurde das infizierte Blattmaterial geerntet und über Nacht bei Raumtemperatur entfärbt. Zur Mikroskopie wurde das Blattmaterial mit Coomassie-Lösung bedeckt und nach 5 min die Lösung mit etwas Wasser abgespült. Direkt danach wurde die Probe mikroskopiert.

b) Calcofluor-Färbung

[0170] Zur Herstellung der Calcofluor-Färbelösung wurden 0,03% Calcofluor White (Sigma-Aldrich) in 50mM Tris/HCl pH 8,0 und 0,01 % Tween 20 gelöst. Zur Anfärbung der extrazellulären Pilzstrukturen wurde das infizierte Blatt 30 sec in die Färbelösung getaucht und anschließend 10 sec mit Wasser gewaschen. Die angefärbten pilzlichen Strukturen fluoreszieren unter UV-Anregung hellblau.

c) Anillinblau-Färbung

[0171] Das Blattmaterial wurde in Falcons oder in Schalen mit Entfärbelösung überführt und über Nacht bei RT inkubiert. Danach wurde die Entfärbelösung entfernt und die Blätter 2 x mit Wasser gewaschen. Für die Färbung wurden die Blätter 1.5 - 2 h mit Anillinblau-Färbelösung bedeckt und anschließend direkt mikroskopiert.

d) Weizenkeim Agglutinin-Alexa Fluor 488-Färbung (WGA-Färbung)

[0172] Für die WGA-Färbung von *P. pachyrhizi* wurden inokulierte Gerstenblätter 30 - 45 min bei RT in 10 % (w/v) KOH eingelegt. Inokulierte Sojablätter wurden in 1 cm² Stückchen geschnitten und 5 min in 10 % (w/v) KOH gekocht. Anschließend wurden die Gerste- und die Sojablätter 5 x 3 - 5 min mit 1 x PBS-Puffer gewaschen. Zur Färbung wurde das Blattmaterial in WGA-Färbelösung eingelegt und 10 min bei 100 mbar Restdruck infiltriert. Daraufhin wurde das Material direkt mikroskopiert oder in der Färbelösung bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

Beispiel 2 Transiente ballistische Transformation von Pflanzenzellen

[0173] Für die transiente Überexpression des Bax-Inhibitors (für Konstrukte und sonstige Methoden siehe Patent WO2004/081217) durch ballistische Transformation wurden 30 - 100 mg Goldpartikel abgewogen in 1 ml 70 % EtOH resuspendiert und 3-5 min geschüttelt. Nach einer Inkubation von 1 h bei Raumtemperatur erfolgte eine Pelletierung durch Zentrifugation (1 min 10,000 rpm, Mikrozentrifuge Eppendorf). Danach wurden die Partikel 3 x mit sterilem Wasser gewaschen und anschließend in sterilen 50 % (v/v) Glycerin aufgenommen und bei 4 °C gelagert. Die Lösung enthielt bei Einwaage von 30 mg Goldpartikeln ca. 25 mg/ml Gold. Vor der Verwendung wurden die Partikel noch einmal zur gründlichen Verteilung geschüttelt und für 15 sec im Ultraschallbad sonifiziert.

[0174] Im Allgemeinen wurde eine Goldpartikelmenge für mindestens drei Schuss vorbereitet. Bis zur Fällung wurde nach jedem Schritt der Ansatz mit dem Vortexer für einige Sekunden kräftig geschüttelt. Für die DNA-Fällung auf Goldpartikel für 3 Schuss wurden aus der gut aufgeschüttelten Goldpartikel-Glycerinlösung 12.5 µl entnommen und mit der gewünschten DNA (pGY1-BI-1, pGY1-GFP, pGY1, siehe WO2004/081217) versetzt. Dabei wurden pro Schuss und Plasmid 1.6 µg/µl DNA eingesetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 12.5 µl 2.5 M CaCl₂-Lösung und 5 µl 0.1 M Spermidine-Lösung. Das Gemisch wurde 3 min geschüttelt, mit 70 µl 70% (v/v) Ethanol versetzt und vorsichtig invertiert. Nach Zugabe von 70 µl 100% Ethanol wurde der Ansatz nochmals durch invertieren gründlich gemischt und bis zu 1 h bei -20 °C inkubiert. Die Partikel wurden durch Zentrifugation pelletiert (1 min, 11000 rpm, Mikrozentrifuge Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) in 18 µl 100 % Ethanol resuspendiert und möglichst gleichmäßig in einem Radius von ca. 1 cm auf den Macrocarriern (Bio-Rad, München) verteilt, die zuvor mit 100 % Ethanol gewaschen und getrocknet worden waren. Die Makrocarrier wurden dann bei Raumtemperatur inkubiert bis der Ethanol vollständig verdampft war.

[0175] Die transiente ballistische Transformation von Gerste und Sojablättern erfolgte mit dem Biolistic Particle Delivery System PDS-1000/He System (Bio-Rad, München). Für die Transformation wurden bevorzugt Gerstenblätter von 7 Tage alten Gerstepflanzen (Sorte, Hanna') oder die ersten Laubblätter (Zweiblattstadium) von Sojapflanzen (Sorte ,Oxford') verwendet. Die zu transformierenden Blätter wurden auf 1 % (w/v) Wasser-Agar gelegt und mit einem Metallring fixiert.

[0176] Um das optimale Verhältnis zwischen angelegtem Druck und Restdruck in der Vakuumkammer für die Transformation zu bestimmen, wurden verschiedene Druck/Restdruck-Kombinationen getestet. Dabei wurden Restdrücke von 15-27 inch Hg und ,Rupture Disks' von 650 - 1800 Psi Sollbruchstärke verwendet. Nach dem Beschuss wurde die Kammer wieder belüftet, die Platte mit den Blättern entnommen und diese vor der Mikroskopie oder Färbung mindestens 24 h bei Raumtemperatur inkubiert.

[0177] Für die ballistische Transformation der Blätter wurden Goldpartikel verwendet. Dabei stellte sich heraus, dass für Gerste der Beschuss mit Partikeln von 0,6 µm Durchmesser am besten geeignet war, da sie weniger Verletzungen

des Gewebes hervorriefen. Bei der transienten Transformation von Soja wurde mit den Partikeln von 1 µm die höchste Transformationsrate erreicht.

[0178] Für die erfolgreiche transiente Transformation müssen die Verhältnisse zwischen dem Druck zur Beschleunigung der Partikel, dem Restdruck in der Vakuumkammer und dem Abstand der Probe zu den Partikeln aufeinander abgestimmt werden. Um dies zu erreichen wurden für Gerste- und Sojablätter verschiedene Bedingungen getestet. Bei Soja bewährte sich ein Druck von 900 Psi mit 25 inch Hg Restdruck in der Vakuumkammer und einem Abstand der Probe von 9 cm (FIG. 7A). Bei Gerstebältern wurden die höchsten Zellzahlen mit einem Druck von 1100 psi, 25 inch Hg Restdruck in der Vakuumkammer und einem Abstand der Blätter zu den Partikeln von 9 cm erreicht (FIG. 7B).

[0179] Zur Untersuchung der Effekte von BI-1 auf die Interaktion zwischen *P. pachyrhizi* und Gerste wurde die transiente ballistische Transformation angewandt. Die Primärbälter von sieben Tage alten Gerstepflanzen (Sorte ‚Hanna‘) wurden mit Überexpressionskonstrukten von BI-1 (pGY1-BI-1, Hückelhoven R. et al., 2001) beschossen. Diese Plasmide tragen einen CAMV 35S Promoter, der eine konstitutive Expression der Gene gewährleistet. Als Reporter gen wurde ein CAMV 35S-GFP Konstrukt zusammen mit den Expressionsplasmiden in die Zellen geschossen (Schweizer P. et al., MPMI 12, 647 (1999)). Für die Kontrolle wurde der leere Vektor pGY-1 zusammen mit dem GFP-Reporter genkonstrukt verwendet. Die Inokulation mit *P. pachyrhizi* erfolgte 24 h nach der Transformation durch Präzipitation aus einer Sporensuspension (Überschichtungsmethode, 2-3 x 10⁴ Sporen/ml). Nach 18 h Inkubation wurden nach Calcofluor-Färbung der extrazellulären Pilzstrukturen die Interaktionen mikroskopisch ausgewertet. Gezählt wurden GFP-bildende Zellen, die von dem Pilz penetriert wurden und GFP-bildende Zellen die von dem Pilz attackiert wurden, diesen aber entweder erfolgreich abwehren konnten (oder wo der Pilz vor einer Penetration abgestorben ist). Zusätzlich wurden die GFP-bildenden Zellen insgesamt gezählt. Für die Auswertung wurden die relativen Penetrationsraten in Bezug auf die gesamten transformierten mit Sojarost interagierenden Zellen berechnet.

[0180] In der Kontrolle wurden über die Versuche gemittelt 53 % der transformierten mit *P. pachyrhizi* interagierenden Zellen penetriert, während von den mit BI-1 transformierten Zellen nur 37 % penetriert wurden (siehe Tabelle FIG. 10 und FIG. 8). Nach der Auswertung zeigen die transient mit BI-1 transformierten Zellen eine signifikant erhöhte Penetrationsresistenz gegen *P. pachyrhizi*. Auffällig war bei der mikroskopischen Beobachtung, dass die BI-1 bildenden Zellen deutlich vitaler wirkten als Zellen die nur GFP exprimierten.

Beispiel 3 Stabile Transformation von Gerste und Nachweis des GFP:BI-1-Transgens

[0181] Zur genaueren Untersuchung des Einflusses von BI-1 auf die Interaktion von Gerste mit *Phakopsora pachyrhizi* wurden stabil transformierte Gerstenpflanzen hergestellt, die ein GFP:BI-1 Fusionsprotein überexprimieren. Die dazu verwendete Agrobakterium-vermittelte stabile Transformation ist eine seit Jahren etablierte Technik, deren Methoden bereits in vielen Review-Artikeln veröffentlicht sind (Cheng Z. et al., *Plant Mol. Biol.* 60, 583 (2004); Taylor et al., *DNA & Cell Biology.* 21(12), 963 (2002); Rakoczy-Trojanowska, *Cellular & Molecular Biology Letters.* 7(3), 849 (2002); Grabowska A., *Acta Physiologiae Plantarum.* 26(4), 451 (2004); Chesnokov V., *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya.* 1, 26 (2004). Auch die Transformation von monokotylen Spezies wie z.B. Gerste, die in den 1990er Jahren noch schwierig war, ist inzwischen zu einer Standardtechnik geworden (Travella S. et al., *Plant Cell Reports* 23(12), 780 (2005); Murray F. et al., *Plant Cell Reports* 22(6), 397 (2004)).

[0182] Da es bei den erhaltenen transgenen Pflanzen nicht bekannt war, ob es sich um homozygote Linien handelte, musste zunächst das Vorhandensein des Überexpressionskonstrukts nachgewiesen werden. Dazu wurde von allen Pflanzen aus einem Blatt die genomische DNA isoliert. Verwendet wurde das DNeasy 96 Plant Kit (Quiagen, Hilden; nach Angaben des Herstellers).

[0183] Der Nachweis des Überexpressionskonstrukts GFP-BI-1 erfolgte mit GFP-spezifischen Primern mittels PCR auf das Vorhandensein des Konstruktes überprüft. Bei der In vitro-Amplifikation von DNA durch PCR (Mullis & Faloona, 1987) wurde die Phusion Hot Start (Finnzymes, Espoo) verwendet.

Primer 1: 5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3' (SEQ ID NO: 47)

Primer 2: 5'-TTGAACAACGATGTGCAAGACTCCTTGACAGCTCGTCCATGC-3' (SEQ ID NO: 48)

PCR- Ansatz zum Nachweis des GFP:BI-1 Transgens:

[0184]

DMSO	0,6 µl
Puffer (5x) (F-519 GC)	4 µl
DNA	3 µl
dNTP-Mix (10mM each)	0.4 µl

EP 2 081 954 B1

(fortgesetzt)

5	Primer 1 (20 pmol)	1 µl
	Primer 2 (20 pmol)	1 µl
	Hot Start Phusion F 540L	0,2 µl
	Wasser	9,8 µl

[0185] Die PCR wurde in einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel (Tgradient; Biometra, Göttingen) durchgeführt.

10 PCR- Programm:

[0186]

15	1	Initiale Denaturation	98°C	30sec	
	2.	Denaturation	98°C	10secs	35 Zyklen der Schritte 2-4
	3.	Annealing	58°C	30sec	
	4.	Elongation	72°C	30sec	
	5.	Elongation	72°C	5 min	
20	6.	Storage	4°C		

[0187] Unter Verwendung von Standardmethoden wurde die DNA durch Gelelektrophorese in einem 1 % Agarosegel ([w/v], INVITROGEN, Karlsruhe; in 1 x TAE Puffer) aufgetrennt und analysiert (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY) 1989).

25 **[0188]** Bei insgesamt sechs Pflanzen von den transgenen Linien #6(2)E15L7P2 (T2) und #6(1)E8L1(T1) konnte das GFP-Fragment von 740 bp und damit das Konstrukt nicht nachgewiesen werden. Die Werte dieser Pflanzen [Pflanze 5, 10 und 19 der Linie #6(1)E8L1(T1) sowie Pflanze 3, 11 und 12 der Linie #6(2)E15L7P2 (T2)] wurden daher in den folgenden Berechnungen nicht berücksichtigt. (siehe FIG. 9).

30 Beispiel 4 : Interaktion von *P. pachyrhizi* mit transgener Bax Inhibitor-1 überexprimierender Gerste

[0189] Um den resistenzerhöhenden Effekt durch transiente Überexpression von BI-1 zu bestätigen, wurde die Interaktion zwischen *P. pachyrhizi* und transgenen Gerstenpflanzen der Sorte ‚Golden Promise‘ (GP), die ein GFP-BI-1 Überexpressionskonstrukt enthalten im Vergleich zum Wildtyp (WT) der Sorte mikroskopisch untersucht. Für die Herstellung der transgenen Pflanzen wurde eine GFP-BI-1 Fusion unter der Kontrolle des konstitutiven CAMV 35S Promoters verwendet und so eine ausreichende Expression des Proteins gewährleistet.

35 **[0190]** Es wurden jeweils 20 Pflanzen des Wildtyps und von vier transgenen Linien #6(1)E4L3P5 (T2), 1#6(2)E15L7P1 (T2), #6(2)E15L7P2 (T2) und #6(1)E8L1(T1) angezogen. Von der Linie #6(2)E15L7P2 (T2) sind nur 14 Pflanzen aus den Samen aufgelaufen. Da nur begrenzt Saatgut zur Verfügung stand, wurden die Versuche mit einer geringeren Anzahl von Pflanzen dieser Linie durchgeführt. Sieben Tage nach der Aussaat wurde das Primärblatt entnommen, mit Hilfe des Fallturms mit *P. pachyrhizi* inokuliert und 24 h nach der Inokulation in Entfärbelösung fixiert. Nach der vollständigen Entfärbung wurden die Blätter mit Anillinblau gefärbt. Anilinblau lagert sich in die Struktur von Kallose ein und färbt so bevorzugt Papillen an, bei denen es zur Akkumulation und Vernetzung von Kallose mit anderen polymeren Substanzen kommt. Zellen, die durch eine hypersensitive Reaktion (HR), einen der Apoptose in Säugerzellen ähnlichen Prozess durchlaufen haben, zeigen nach Anillinblaufärbung ebenfalls eine helle Fluoreszenz. Auf den inokulierten Gerstebältern wurde die Anzahl der Sporen, die gekeimten Sporen mit Keimschläuchen die bereits ein Appressorium gebildet hatten und, als Zellreaktion, die Appressorien mit darunter liegenden Papillen sowie die HR gezählt. Größere Sporenzusammenballungen, bei denen eine Zuordnung der Appressorien zu den Sporen nicht mehr möglich war, wurden nicht mitgezählt. Es wurden, soweit möglich, pro Blatt mindestens 100 Sporen mit Appressorien ausgezählt (siehe Tabelle in FIG. 11)

40 **[0191]** Bei der mikroskopischen Analyse der Blätter war eine Papillenbildung zu erkennen, welche in den transgenen Linien häufig deutlich verstärkt war. Dagegen war in den transgenen Pflanzen das Auftreten der HR bei den infizierten Zellen seltener zu beobachten. Im Wildtyp wurden durchschnittlich in 36 % der befallenen Zellen Papillen als Abwehrreaktion gebildet, 45 % der Zellen reagierten mit einer HR. Dagegen betrug der Anteil der Papillenbildung in den transgenen Linien zwischen 50-60 %. Deutlich niedriger war im Vergleich zum Wildtyp auch der Anteil der HR mit 16-26 % (FIG. 12). Nach der Überprüfung mit dem sogenannten "Student Test" (t-Test) ist die relative Papillenbildung in den transgenen Linien gegenüber dem WT signifikant erhöht und die HR signifikant erniedrigt ($P < 0.001$). Der BI-1 verhindert

EP 2 081 954 B1

den Beobachtungen in diesen Versuchen gemäß den programmierten Zelltod und fördert als alternative Abwehr die Papillenbildung der Zellen.

Beispiel 5 : Interaktion von *P. pachyrhizi* mit transgener Bax Inhibitor-1 überexprimierender Soja

- 5
- [0192]** Nach an sich bekannten Methoden wurden Sojapflanzen, welche NtBI-1 überexprimieren hergestellt und wie voranstehend beschrieben mit *P. pachyrhizi* inokuliert. Die mit NtBI-1 transformierten Sojapflanzen zeigen im Vergleich zu den Wildtyp-Sojapflanzen eine deutliche Reduktion an Befall mit Sojarost - die Reduktion liegt im Durchschnitt im Bereich von über 30%.
- 10
- [0193]** Ebenso wurden Sojapflanzen, welche mit NTBI-1 und mit SELDA transformiert wurden, bereitgestellt und wie voranstehend beschrieben mit *P. pachyrhizi* inokuliert. Die mit NtBI-1 + SELDA transformierten Sojapflanzen zeigen im Vergleich zu den Wildtyp-Sojapflanzen ebenfalls eine signifikante Reduktion an Befall mit Sojarost - die Reduktion liegt hier im Durchschnitt im Bereich von über 15 %.

15 SEQUENZPROTOKOLL

[0194]

- 20
- <110> BASF Plant Science GmbH
- <120> verfahren zur Erhöhung der Resistenz gegen Pilze in Pflanzen
- <130> PF 58494
- 25
- <150> EP 06122870.6
<141> 2006-10-24
- <160> 48
- 30
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
<211> 744
<212> DNA
- 35
- <213> Hordeum vulgare
- <220>
<221> CDS
<222> (1)..(741)
- 40
- <223> coding for B11-protein
- <400> 1

45

50

55

EP 2 081 954 B1

atg gac gcc ttc tac tcg acc tcg tcg gcg gcg gcg agc ggc tgg ggc 48
 Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ser Gly Trp Gly
 1 5 10

cac gac tcc ctc aag aac ttc cgc cag atc tcc ccc gcc gtg cag tcc 96
 His Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala Val Gln Ser
 20 25 30

cac ctc aag ctc gtt tac ctg act cta tgc ttt gca ctg gcc tca tct 144
 His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Phe Ala Leu Ala Ser Ser
 35 40 45

gcc gtg ggt gct tac cta cac att gcc ctg aac atc ggc ggg atg ctg 192
 Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu
 50 55 60

aca atg ctc gct tgt gtc gga act atc gcc tgg atg ttc tcg gtg cca 240
 Thr Met Leu Ala Cys Val Gly Thr Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro
 65 70 75 80

gtc tat gag gag agg aag agg ttt ggg ctg ctg atg ggt gca gcc ctc 288
 Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu
 85 90 95

ctg gaa ggg gct tcg gtt gga cct ctg att gag ctt gcc ata gac ttt 336
 Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe
 100 105 110

gac cca agc atc ctc gtg aca ggg ttt gtc gga acc gcc atc gcc ttt 384
 Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe
 115 120 125

ggg tgc ttc tct ggc gcc gcc atc atc gcc aag cgc agg gag tac ctg 432
 Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu
 130 135 140

tac ctc ggt ggc ctg ctc tcg tct ggc ctg tcg atc ctg ctc tgg ctg 480
 Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu
 145 150 155

cag ttt gtc acg tcc atc ttt ggc cac tcc tct ggc agc ttc atg ttt 528
 Gln Phe Val Thr Ser Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe
 165 170 175

gag gtt tac ttt ggc ctg ttg atc ttc ctg ggg tac atg gtg tac gac 576
 Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp
 180 185 190

acg cag gag atc atc gag agg gcg cac cat ggc gac atg gac tac atc 624
 Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile
 195 200 205

aag cac gcc ctc acc ctc ttc acc gac ttt gtt gcc gtc ctc gtc cga 672
 Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg
 210 215 220

gtc ctc atc atc atg ctc aag aac gca ggc gac aag tcg gag gac aag 720
 Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys
 225 230 235 240

aag aag agg aag agg ggg tcc tga 744
 Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser
 245

55

<210> 2
 <211> 247
 <212> PRT

EP 2 081 954 B1

<213> Hordeum vulgare

<400> 2

5 Met Asp Ala Phe Tyr₅ Ser Thr Ser Ser Ala₁₀ Ala Ala Ser Gly Trp₁₅ Gly
 His Asp Ser Leu₂₀ Lys Asn Phe Arg Gln₂₅ Ile Ser Pro Ala Val₃₀ Gln Ser
 10 His Leu Lys₃₅ Leu Val Tyr Leu Thr₄₀ Leu Cys Phe Ala Leu₄₅ Ala Ser Ser
 Ala Val₅₀ Gly Ala Tyr Leu His₅₅ Ile Ala Leu Asn Ile₆₀ Gly Gly Met Leu
 15 Thr Met Leu Ala Cys Val₇₀ Gly Thr Ile Ala Trp₇₅ Met Phe Ser Val₈₀ Pro
 Val Tyr Glu Glu Arg₈₅ Lys Arg Phe Gly Leu₉₀ Leu Met Gly Ala Ala₉₅ Leu
 20 Leu Glu Gly Ala₁₀₀ Ser Val Gly Pro Leu₁₀₅ Ile Glu Leu Ala Ile₁₁₀ Asp Phe
 Asp Pro Ser₁₁₅ Ile Leu Val Thr Gly₁₂₀ Phe Val Gly Thr Ala₁₂₅ Ile Ala Phe
 25 Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala₁₃₅ Ile Ile Ala Lys Arg₁₄₀ Arg Glu Tyr Leu
 Tyr Leu Gly Gly Leu₁₅₀ Ser Ser Gly Leu Ser₁₅₅ Ile Leu Leu Trp Leu₁₆₀
 30 Gln Phe Val Thr Ser₁₆₅ Ile Phe Gly His Ser₁₇₀ Ser Gly Ser Phe Met₁₇₅ Phe
 Glu Val Tyr Phe₁₈₀ Gly Leu Leu Ile Phe₁₈₅ Leu Gly Tyr Met Val₁₉₀ Tyr Asp
 35 Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala₂₀₀ His His Gly Asp Met₂₀₅ Asp Tyr Ile
 Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg
 40 210 215 220
 Val Leu Ile Ile Met Leu₂₃₀ Lys Asn Ala Gly Asp₂₃₅ Lys Ser Glu Asp Lys₂₄₀
 Lys Lys Arg Lys Arg₂₄₅ Gly Ser

<210> 3

<211> 1067

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

50

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(741)

<223> coding for B11-protein

55

<400> 3

EP 2 081 954 B1

	atg	gat	gcg	ttc	tct	tcc	ttc	ttc	gat	tct	caa	cct	ggt	agc	aga	agc	48
	Met	Asp	Ala	Phe	Ser	Ser	Phe	Phe	Asp	Ser	Gln	Pro	Gly	Ser	Arg	Ser	
	1				5				10					15			
5	tgg	agc	tat	gat	tct	ctt	aaa	aac	ttc	cgt	cag	att	tct	cca	gcc	gtt	96
	Trp	Ser	Tyr	Asp	Ser	Leu	Lys	Asn	Phe	Arg	Gln	Ile	Ser	Pro	Ala	Val	
				20					25					30			
10	cag	aat	cat	ctt	aaa	cgg	ggt	tat	ttg	acc	tta	tgt	tgt	gct	ctt	gtg	144
	Gln	Asn	His	Leu	Lys	Arg	Val	Tyr	Leu	Thr	Leu	Cys	Cys	Ala	Leu	Val	
			35					40					45				
15	gcg	tct	gcc	ttt	gga	gct	tac	ctc	cat	gtg	ctc	tgg	aat	atc	ggc	ggt	192
	Ala	Ser	Ala	Phe	Gly	Ala	Tyr	Leu	His	Val	Leu	Trp	Asn	Ile	Gly	Gly	
		50					55					60					
20	att	ctt	aca	acg	att	gga	tgt	att	gga	act	atg	att	tgg	ctc	ctt	tca	240
	Ile	Leu	Thr	Thr	Ile	Gly	Cys	Ile	Gly	Thr	Met	Ile	Trp	Leu	Leu	Ser	
	65					70					75					80	
25	tgt	cct	cct	tat	gaa	cac	caa	aaa	agg	ctt	tct	ctt	ctg	ttt	gtg	tct	288
	Cys	Pro	Pro	Tyr	Glu	His	Gln	Lys	Arg	Leu	Ser	Leu	Leu	Phe	Val	Ser	
					85					90					95		
30	gct	ggt	ctt	gaa	ggt	gct	tct	ggt	ggc	ccc	ttg	atc	aaa	gtg	gca	att	336
	Ala	Val	Leu	Glu	Gly	Ala	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ile	Lys	Val	Ala	Ile	
				100					105					110			
35	gat	ggt	gac	cca	agc	atc	ctt	atc	act	gca	ttt	ggt	gga	act	gcg	ata	384
	Asp	Val	Asp	Pro	Ser	Ile	Leu	Ile	Thr	Ala	Phe	Val	Gly	Thr	Ala	Ile	
			115					120					125				
40	gcg	ttt	gtc	tgt	ttc	tca	gca	gca	gca	atg	tta	gca	aga	cgc	agg	gag	432
	Ala	Phe	Val	Cys	Phe	Ser	Ala	Ala	Ala	Met	Leu	Ala	Arg	Arg	Arg	Glu	
		130					135					140					
45	tat	ctc	tac	ctt	gga	gga	ctg	ctt	tca	tct	ggc	ttg	tct	atg	cta	atg	480
	Tyr	Leu	Tyr	Leu	Gly	Gly	Leu	Leu	Ser	Ser	Gly	Leu	Ser	Met	Leu	Met	
	145				150						155				160		
50	tgg	ctc	cag	ttt	gcc	tct	tca	atc	ttt	ggt	ggc	tct	gca	tct	atc	ttt	528
	Trp	Leu	Gln	Phe	Ala	Ser	Ser	Ile	Phe	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Ile	Phe	
				165						170					175		
55	aag	ttt	gag	ttg	tac	ttt	gga	ctt	ttg	atc	ttt	gtg	gga	tac	atg	gtg	576
	Lys	Phe	Glu	Leu	Tyr	Phe	Gly	Leu	Leu	Ile	Phe	Val	Gly	Tyr	Met	Val	
				180					185					190			

EP 2 081 954 B1

gtg gac aca caa gag att ata gaa aag gca cac ctc ggt gac atg gac 624
Val Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp Met Asp
195 200 205

5 tat gta aaa cat tcg ttg acc ctt ttc act gac ttt gta gct gtg ttt 672
Tyr Val Lys His Ser Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Phe
210 215 220

gtt cgg att ctc atc ata atg ttg aag aac tca gca gat aaa gaa gag 720
Val Arg Ile Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ala Asp Lys Glu Glu
225 230 235 240

10 aag aag aag aaa agg aga aac tgaggggatg taaagtaaata ttaactttat 771
Lys Lys Lys Lys Arg Arg Asn
245

ggttgttatc gtgtgtggcc actttgaaga tattacttgt tagcactctc tattggtgac 831
cagacatggt tccactaaaa aggatctgct tgtttcaactt ctgcacaagt accatcttca 891
gattgtaaata gactcgagtg ttgttcttct tttcataaac ttttgttctt taagagtttg 951
gttctactga ttgcatctta ccaagctaag aataatgtag gaaaatgata atcctgttta 1011
20 aattttctaa aatgtgtgca tttcagaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1067

<210> 4

<211> 247

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 4

30 Met Asp Ala Phe Ser Ser Phe Phe Asp Ser Gln Pro Gly Ser Arg Ser
1 5 10
Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala Val
20 25 30

35 Gln Asn His Leu Lys Arg Val Tyr Leu Thr Leu Cys Cys Ala Leu Val
35 40 45
Ala Ser Ala Phe Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly
50 55 60
40 Ile Leu Thr Thr Ile Gly Cys Ile Gly Thr Met Ile Trp Leu Leu Ser
65 70 75 80
Cys Pro Pro Tyr Glu His Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Phe Val Ser
85 90 95

45 Ala Val Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Val Ala Ile
100 105 110
Asp Val Asp Pro Ser Ile Leu Ile Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile
115 120 125

50 Ala Phe Val Cys Phe Ser Ala Ala Ala Met Leu Ala Arg Arg Arg Glu
130 135 140
Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Met Leu Met
145 150 155 160

55 Trp Leu Gln Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Ala Ser Ile Phe
165 170 175
Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Val Gly Tyr Met Val
180 185 190

EP 2 081 954 B1

Val Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp Met Asp
195 200 205

5

Tyr Val Lys His Ser Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Phe
210 215 220

Val Arg Ile Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ala Asp Lys Glu Glu
225 230 235 240

10

Lys Lys Lys Lys Arg Arg Asn
245

<210> 5

<211> 1160

<212> DNA

15

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(747)

20

<223> coding for B11-protein

<400> 5

25

30

35

40

45

50

55

EP 2 081 954 B1

	atg	gag	tct	tgc	aca	tcg	ttc	ttc	aat	tca	cag	tcg	gcg	tcg	tct	cgc	48
	Met	Glu	Ser	Cys	Thr	Ser	Phe	Phe	Asn	Ser	Gln	Ser	Ala	Ser	Ser	Arg	
	1				5				10					15			
5	aat	cgc	tgg	agt	tac	gat	tct	ctt	aag	aac	ttc	cgc	cag	atc	tct	ccc	96
	Asn	Arg	Trp	Ser	Tyr	Asp	Ser	Leu	Lys	Asn	Phe	Arg	Gln	Ile	Ser	Pro	
				20					25					30			
10	ttt	gtt	caa	act	cat	ctc	aaa	aag	gtc	tac	ctt	tca	tta	tgt	tgt	gct	144
	Phe	Val	Gln	Thr	His	Leu	Lys	Lys	Val	Tyr	Leu	Ser	Leu	Cys	Cys	Ala	
			35					40					45				
15	tta	gtt	gct	tcg	gct	gct	gga	gct	tac	ctt	cac	att	ctt	tgg	aac	att	192
	Leu	Val	Ala	Ser	Ala	Ala	Gly	Ala	Tyr	Leu	His	Ile	Leu	Trp	Asn	Ile	
		50					55					60					
20	ggt	ggc	tta	ctt	acg	aca	ttg	gga	tgt	gtg	gga	agc	ata	gtg	tgg	ctg	240
	Gly	Gly	Leu	Leu	Thr	Thr	Leu	Gly	Cys	Val	Gly	Ser	Ile	Val	Trp	Leu	
	65				70			75								80	
25	atg	gcg	aca	cct	ctg	tat	gaa	gag	caa	aag	agg	ata	gca	ctt	ctg	atg	288
	Met	Ala	Thr	Pro	Leu	Tyr	Glu	Glu	Gln	Lys	Arg	Ile	Ala	Leu	Leu	Met	
				85						90					95		
30	gca	gct	gca	ctg	ttt	aaa	gga	gca	tct	att	ggt	cca	ctg	att	gaa	ttg	336
	Ala	Ala	Ala	Leu	Phe	Lys	Gly	Ala	Ser	Ile	Gly	Pro	Leu	Ile	Glu	Leu	
				100					105					110			
35	gct	att	gac	ttt	gac	cca	agc	att	gtg	atc	ggt	gct	ttt	gtt	ggt	tgt	384
	Ala	Ile	Asp	Phe	Asp	Pro	Ser	Ile	Val	Ile	Gly	Ala	Phe	Val	Gly	Cys	
			115					120					125				
40	gct	gtg	gct	ttt	ggt	tgc	ttc	tca	gct	gct	gcc	atg	gtg	gca	agg	cgc	432
	Ala	Val	Ala	Phe	Gly	Cys	Phe	Ser	Ala	Ala	Ala	Met	Val	Ala	Arg	Arg	
		130					135					140					
45	aga	gag	tac	ttg	tat	ctt	gga	ggt	ctt	ctt	tca	tct	ggt	ctc	tct	atc	480
	Arg	Glu	Tyr	Leu	Tyr	Leu	Gly	Gly	Leu	Leu	Ser	Ser	Gly	Leu	Ser	Ile	
	145					150					155					160	
50	ctt	ttc	tgg	ttg	cac	ttc	gcg	tcc	tcc	att	ttt	ggt	ggt	tct	atg	gcc	528
	Leu	Phe	Trp	Leu	His	Phe	Ala	Ser	Ser	Ile	Phe	Gly	Gly	Ser	Met	Ala	
					165					170					175		
55																	

EP 2 081 954 B1

	ttg ttc aag ttc gag gtt tat ttt ggg ctc ttg gtg ttt gtg ggc tat	576
	Leu Phe Lys Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr	
	180 185 190	
5	atc att ttt gac acc caa gat ata att gag aag gca cac ctt ggg gat	624
	Ile Ile Phe Asp Thr Gln Asp Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp	
	195 200 205	
10	ttg gac tac gtg aag cat gct ctg acc ctc ttt aca gat ttt gtt gct	672
	Leu Asp Tyr Val Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala	
	210 215 220	
15	gtt ttt gtg cga ata tta atc ata atg ctg aag aat gca tcc gac aag	720
	Val Phe Val Arg Ile Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys	
	225 230 235 240	
20	gaa gag aag aag aag aag agg aga aac taatgcataa gcggttattc	767
	Glu Glu Lys Lys Lys Lys Arg Arg Asn	
	245	
25	aaagactctg taactctaga atctggcatt ttctgttca taaacttctg tagaccttcg	827
	acaagtatgt tgtaaatagt ttggtaacgc ctgagattaa gctgagaggc tctgttatgc	887
	cgcatgccaa tgtggttatg gtggtacata gatggttttg tttccgaagc ataccatcaa	947
	ataacatgca tgtttacct atatcgataa cctacgagtg tactacttat ttctgctccc	1007
	ttttgctgtg ttaggttggt catgattgta tagttgattt tccgttatgt tagaccatct	1067
	tctttcttga cgtttaattt ctcatattga tgggagaaat gaaaattcac accgtcgccc	1127
	caacttgttt aagactgagg cgcaattgta gtt	1160

30 <210> 6
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Nicotiana tabacum

35 <400> 6

40

45

50

55

EP 2 081 954 B1

Met Glu Ser Cys Thr Ser Phe Phe Asn Ser Gln Ser Ala Ser Ser Arg
 1 5 10 15
 5 Asn Arg Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro
 20
 Phe Val Gln Thr His Leu Lys Lys Val Tyr Leu Ser Leu Cys Cys Ala
 35 40 45
 10 Leu Val Ala Ser Ala Ala Gly Ala Tyr Leu His Ile Leu Trp Asn Ile
 50 60
 Gly Gly Leu Leu Thr Thr Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile Val Trp Leu
 65 70 75 80
 15 Met Ala Thr Pro Leu Tyr Glu Glu Gln Lys Arg Ile Ala Leu Leu Met
 85 90 95
 Ala Ala Ala Leu Phe Lys Gly Ala Ser Ile Gly Pro Leu Ile Glu Leu
 100 105 110
 20 Ala Ile Asp Phe Asp Pro Ser Ile Val Ile Gly Ala Phe Val Gly Cys
 115 120 125
 Ala Val Ala Phe Gly Cys Phe Ser Ala Ala Ala Met Val Ala Arg Arg
 130 135 140
 25 Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile
 145 150 155 160
 30 Leu Phe Trp Leu His Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Met Ala
 165 170 175
 Leu Phe Lys Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr
 180 185 190
 35 Ile Ile Phe Asp Thr Gln Asp Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp
 195 200 205
 Leu Asp Tyr Val Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala
 210 215 220
 40 Val Phe Val Arg Ile Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys
 225 230 235 240
 Glu Glu Lys Lys Lys Lys Arg Arg Asn
 245

<210> 7
 <211> 1056
 45 <212> DNA
 <213> Oryza sativa

<220>
 <221> CDS
 50 <222> (1)..(747)
 <223> coding for B11-protein

<400> 7

55

EP 2 081 954 B1

	atg	gac	gcc	ttc	tac	tcg	acc	tcg	tcg	gcg	tac	gga	gcg	gcg	gcg	agc	48
	Met	Asp	Ala	Phe	Tyr	Ser	Thr	Ser	Ser	Ala	Tyr	Gly	Ala	Ala	Ala	Ser	
	1				5					10					15		
5	ggc	tgg	ggc	tac	gac	tcg	ctg	aag	aac	ttc	cgc	cag	atc	tcc	ccc	gcc	96
	Gly	Trp	Gly	Tyr	Asp	Ser	Leu	Lys	Asn	Phe	Arg	Gln	Ile	Ser	Pro	Ala	
				20					25					30			
10	gtc	cag	tcc	cac	ctc	aag	ctc	gtt	tac	ctg	aca	cta	tgc	gtc	gcc	ctg	144
	Val	Gln	Ser	His	Leu	Lys	Leu	Val	Tyr	Leu	Thr	Leu	Cys	Val	Ala	Leu	
			35					40					45				
15	gct	gcg	tcg	gcg	gtg	ggc	gca	tac	ctg	cac	gtc	gcc	ttg	aac	atc	ggc	192
	Ala	Ala	Ser	Ala	Val	Gly	Ala	Tyr	Leu	His	Val	Ala	Leu	Asn	Ile	Gly	
		50					55					60					
20	ggg	atg	ttg	act	atg	ctc	ggg	tgc	gtg	ggg	agc	atc	gcc	tgg	ttg	ttc	240
	Gly	Met	Leu	Thr	Met	Leu	Gly	Cys	Val	Gly	Ser	Ile	Ala	Trp	Leu	Phe	
	65					70					75					80	
25	tcg	gtg	cct	gtc	ttt	gag	gag	agg	aag	agg	ttt	ggg	att	ctc	ttg	gcc	288
	Ser	Val	Pro	Val	Phe	Glu	Glu	Arg	Lys	Arg	Phe	Gly	Ile	Leu	Leu	Ala	
					85					90					95		
30	gct	gcc	ctg	ctg	gaa	ggg	gct	tca	gtt	ggg	cct	ctg	atc	aag	ctt	gct	336
	Ala	Ala	Leu	Leu	Glu	Gly	Ala	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Ile	Lys	Leu	Ala	
				100					105					110			
35	gta	gac	ttt	gac	tca	agc	att	ctc	gta	aca	gca	ttt	gtt	gga	act	gcc	384
	Val	Asp	Phe	Asp	Ser	Ser	Ile	Leu	Val	Thr	Ala	Phe	Val	Gly	Thr	Ala	
			115					120					125				
40	att	gca	ttt	ggg	tgc	ttc	act	tgc	gct	gcc	atc	gtt	gcc	aag	cgt	agg	432
	Ile	Ala	Phe	Gly	Cys	Phe	Thr	Cys	Ala	Ala	Ile	Val	Ala	Lys	Arg	Arg	
		130					135					140					

EP 2 081 954 B1

gag tac ctc tac ctt ggt ggt ttg ctc tct tct ggc ctc tcc atc ctg 480
 Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu 160
 145

5 ctc tgg ctg cag ttt gcc gca tcc atc ttt ggc cac tcc acc ggc agc 528
 Leu Trp Leu Gln Phe Ala Ala Ser Ile Phe Gly His Ser Thr Gly Ser 175
 165

ttc atg ttt gag gtt tac ttt ggc ctg ttg atc ttc ctg ggg tac atg 576
 Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met 190
 180

gtg tat gac acg cag gag atc atc gag agg gct cac cac ggt gac atg 624
 Val Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met 205
 195 200

15 gac tac atc aag cac gca ctc acc ctc ttc act gac ttc gtg gcc gtc 672
 Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val 220
 210 215

ctt gtc cgg atc ctc gtc atc atg ctc aag aac gcg tct gac aag tcg 720
 Leu Val Arg Ile Leu Val Ile Met Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys Ser 240
 225 230 235

20 gag gag aag aag agg aag aag agg tct tgagagcttc tcttcccgct 767
 Glu Glu Lys Lys Arg Lys Lys Arg Ser 245

25 ttgcacataa gaaaaaacca ccgcggtat tgcctctacg tattatgaca gagccgcact 827
 tcaactgggt tttatgggta atacaagttc ttttgcattt tgttgatagc gtgtgaatct 887
 tctcaggttt gtcgtcgtag tagctttgca aatactagca tgctacatga cacggatcct 947
 tctgtaatgg tggtcgcggt gatcgaaacg tgaaaacaca tcttcatttg cgactaattt 1007
 30 gtttgccttt tggtgattga tgatgatcct ttccccaaaa aaaaaaaaaa 1056

<210> 8

<211> 249

35 <212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 8

40 Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Tyr Gly Ala Ala Ala Ser 15
 1 5 10

Gly Trp Gly Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Ala 30
 20 25 30

45 Val Gln Ser His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Val Ala Leu 45
 35 40 45

Ala Ala Ser Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Val Ala Leu Asn Ile Gly 60
 50 55 60

50 Gly Met Leu Thr Met Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile Ala Trp Leu Phe 80
 65 70 75 80

Ser Val Pro Val Phe Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Ile Leu Leu Ala 95
 85 90 95

55 Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Leu Ala 110
 100 105 110

Val Asp Phe Asp Ser Ser Ile Leu Val Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala 125
 115 120 125

EP 2 081 954 B1

Ile Ala Phe Gly Cys Phe Thr Cys Ala Ala Ile Val Ala Lys Arg Arg
 130 135 140
 5
 Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu
 145 150 155 160
 Leu Trp Leu Gln Phe Ala Ala Ser Ile Phe Gly His Ser Thr Gly Ser
 165 170 175
 10
 Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met
 180 185 190
 Val Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met
 195 200 205
 15
 Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val
 210 215 220
 Leu Val Arg Ile Leu Val Ile Met Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys Ser
 225 230 235 240
 20
 Glu Glu Lys Lys Arg Lys Lys Arg Ser
 245

<210> 9
 <211> 973
 <212> DNA
 <213> Brassica napus
 25
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(741)
 <223> coding for B11-protein
 30
 <400> 9

atg gat tca ttc tcg tcc ttc ttc gat tct caa cct ggt agc aga agc 48
 Met Asp Ser Phe Ser Ser Phe Phe Asp Ser Gln Pro Gly Ser Arg Ser
 1 5 10 15
 35
 tgg agc tat gat tct ctc aaa aac ctc cgt cag att tct ccc tcc gtc 96
 Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Leu Arg Gln Ile Ser Pro Ser Val
 20 25 30
 40
 cag aat cat ctc aag agg gtt tat ctc act ctg tgt tgt gct ctc gtt 144
 Gln Asn His Leu Lys Arg Val Tyr Leu Thr Leu Cys Cys Ala Leu Val
 35 40 45
 45
 gcg tct gcg ttt gga gct tac ctc cac gtg ctc tgg aac ata ggt ggt 192
 Ala Ser Ala Phe Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly
 50
 att ctc act acc att gga tgc ttt gga agc atg att tgg ctg ctc tcc 240
 Ile Leu Thr Thr Ile Gly Cys Phe Gly Ser Met Ile Trp Leu Leu Ser
 65 70 75 80
 50
 tgt cct cct tat gaa caa caa aag agg ctt tcc ctt ctg ttt ctg tct 288
 Cys Pro Pro Tyr Glu Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Phe Leu Ser
 85 90 95
 55
 gct gtt ctc gaa ggt gct tca gtt ggt ccc ttg atc aaa gtg gca gtt 336
 Ala Val Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Val Ala Val
 100 105 110
 gat ttt gac cca agc atc ctc atc act gcg ttt gtc gga act gcg ata 384
 Asp Phe Asp Pro Ser Ile Leu Ile Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile
 115 120 125

EP 2 081 954 B1

gcc ttt atc tgt ttc tca ggg gca gcg atg ttg gca aga cgc aga gag 432
 Ala Phe Ile Cys Phe Ser Gly Ala Ala Met Leu Ala Arg Arg Arg Glu
 130 135 140
 5 tac ctc tac ctc gga gga ctg ctt tca tct ggc ttg tcc atg ctt atg 480
 Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Met Leu Met
 145 150 155
 10 tgg ctt cag ttt gcc tct tcc atc ttt ggt ggc tct gca tcc atc ttt 528
 Trp Leu Gln Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Ala Ser Ile Phe
 165 170 175
 15 aag ttt gag ctc tac ttt gga ctc ttg atc ttt gtg gga tac atg gtg 576
 Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Val Gly Tyr Met Val
 180 185 190
 20 gtg gac act caa gat att ata gag aag gcc cac ctc ggt gac atg gat 624
 Val Asp Thr Gln Asp Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp Met Asp
 195 200 205
 25 tac gtg aaa cat tcg ttg acc ctt ttc acc gat ttt gta gct gtg ttt 672
 Tyr Val Lys His Ser Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Phe
 210 215 220
 30 gtt cgt gtt ctc atc att atg ctg aag aac tcg gca gat aaa gaa gat 720
 Val Arg Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ala Asp Lys Glu Asp
 225 230 235 240
 35 aaa aag aag agg agg agg aac tgagactaaa aagtgagaaa gaaagctaaa 771
 Lys Lys Lys Arg Arg Arg Asn
 245
 40 tagagtgggt gttatgtgtg tttcaaaaaa taaaaaagag tgggtgttat aagtacagac 831
 atgatagcgt tgggtgtttt tacttgtttg gaacagtttt ggtaacaaca cacttacgt 891
 atgtgtgtat tcctcttagt gactccagat tgtgaatgga tcagtatctt gaaactgtgt 951
 tgaaaattat cagttggggag ct 973

35 <210> 10
 <211> 247
 <212> PRT
 <213> Brassica napus
 40 <400> 10

45

50

55

EP 2 081 954 B1

Met Asp Ser Phe Ser Ser Phe Phe Asp Ser Gln Pro Gly Ser Arg Ser
 1 5 10 15
 Trp Ser Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Leu Arg Gln Ile Ser Pro Ser Val
 5 20 25 30
 Gln Asn His Leu Lys Arg Val Tyr Leu Thr Leu Cys Cys Ala Leu Val
 35 40 45
 Ala Ser Ala Phe Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly
 10 50 55 60
 Ile Leu Thr Thr Ile Gly Cys Phe Gly Ser Met Ile Trp Leu Leu Ser
 65 70 75 80
 Cys Pro Pro Tyr Glu Gln Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Phe Leu Ser
 15 85 90 95
 Ala Val Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Lys Val Ala Val
 100 105 110
 Asp Phe Asp Pro Ser Ile Leu Ile Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile
 20
 115 120 125
 Ala Phe Ile Cys Phe Ser Gly Ala Ala Met Leu Ala Arg Arg Arg Glu
 130 135 140
 Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Met Leu Met
 145 150 155 160
 Trp Leu Gln Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Ala Ser Ile Phe
 165 170 175
 Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Val Gly Tyr Met Val
 180 185 190
 Val Asp Thr Gln Asp Ile Ile Glu Lys Ala His Leu Gly Asp Met Asp
 195 200 205
 Tyr Val Lys His Ser Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Phe
 210 215 220
 Val Arg Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ala Asp Lys Glu Asp
 225 230 235 240
 Lys Lys Lys Arg Arg Arg Asn
 245

<210> 11

<211> 747

<212> DNA

<213> Glycine max

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(744)

<223> coding for B11-protein

<400> 11

EP 2 081 954 B1

5 cga ttg caa gca atg gac gcc ttc aat tcc ttc ttc gat tca aga aac 48
 Arg Leu Gln Ala Met Asp Ala Phe Asn Ser Phe Phe Asp Ser Arg Asn
 1 5 10 15

5 cga tgg aat tac gat act ctc aaa aac ttc cgt cag att tct ccg gtc 96
 Arg Trp Asn Tyr Asp Thr Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Val
 20 25 30

10 gtg cag aat cac ctg aag cag gtt tat ttt act ctg tgt ttt gcc gtg 144
 Val Gln Asn His Leu Lys Gln Val Tyr Phe Thr Leu Cys Phe Ala Val
 35 40 45

15 gtt gct gcg gct gtc ggg gct tac ctt cat gtc ctc ttg aac att ggg 192
 Val Ala Ala Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Asn Ile Gly
 50 55 60

15 ggt ttt ctt act aca gtg gca tgc atg gga agc agc ttt tgg tta ctc 240
 Gly Phe Leu Thr Thr Val Ala Cys Met Gly Ser Ser Phe Trp Leu Leu
 65 70 75 80

20 tcc aca cct cct ttt gaa gag agg aag agg gtg act ttg ttg atg gcc 288
 Ser Thr Pro Pro Phe Glu Glu Arg Lys Arg Val Thr Leu Leu Met Ala
 85 90 95

25 gca tca ctg ttt cag ggt tcc tct att gga ccc ttg att gat ttg gct 336
 Ala Ser Leu Phe Gln Gly Ser Ser Ile Gly Pro Leu Ile Asp Leu Ala
 100 105 110

25 att cat atc gat cca agc ctt atc ttt agt gca ttt gtg gga aca gcc 384
 Ile His Ile Asp Pro Ser Leu Ile Phe Ser Ala Phe Val Gly Thr Ala
 115 120 125

30 ttg gcc ttt gca tgc ttc tca gga gca gct ttg gtt gct agg cgt agg 432
 Leu Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Leu Val Ala Arg Arg Arg
 130 135 140

35 gag tac ctg tac ctt ggt ggc ttg gtt tct tct gga ttg tcc atc ctt 480
 Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Val Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu
 145 150 155 160

40 ctc tgg ttg cac ttt gct tct tcc atc ttt gga ggc tca aca gct ctc 528
 Leu Trp Leu His Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Thr Ala Leu
 165 170 175

40 ttt aag ttt gag ttg tac ttt ggg ctt ttg gtg ttt gta ggt tac att 576
 Phe Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Val Phe Val Gly Tyr Ile
 180 185 190

45 gta gta gac acc caa gaa ata gtt gag agg gca cac ttg ggc gat ctg 624
 Val Val Asp Thr Gln Glu Ile Val Glu Arg Ala His Leu Gly Asp Leu
 195 200 205

45 gac tat gta aag cat gcc ttg acc ttg ttt acc gat ttg gtc gca gtt 672
 Asp Tyr Val Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Leu Val Ala Val
 210 215 220

50 ttt gtc cgg att ctt gtt att atg ttg aag aat tcg act gag agg aat 720
 Phe Val Arg Ile Leu Val Ile Met Leu Lys Asn Ser Thr Glu Arg Asn
 225 230 235 240

55 gag aag aaa aag aag aga aga gat tga 747
 Glu Lys Lys Lys Lys Arg Arg Asp

<210> 12
 <211> 248
 <212> PRT

EP 2 081 954 B1

<213> Glycine max

<400> 12

5 Arg Leu Gln Ala Met Asp Ala Phe Asn Ser Phe Phe Asp Ser Arg Asn
1 5 10 15
10 Arg Trp Asn Tyr Asp Thr Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Val
20 25 30
10 Val Gln Asn His Leu Lys Gln Val Tyr Phe Thr Leu Cys Phe Ala Val
35 40 45
15 Val Ala Ala Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Leu Asn Ile Gly
50 55 60
15 Gly Phe Leu Thr Thr Val Ala Cys Met Gly Ser Ser Phe Trp Leu Leu
65 70 75 80
20 Ser Thr Pro Pro Phe Glu Glu Arg Lys Arg Val Thr Leu Leu Met Ala
85 90 95
20 Ala Ser Leu Phe Gln Gly Ser Ser Ile Gly Pro Leu Ile Asp Leu Ala
100 105 110
25 Ile His Ile Asp Pro Ser Leu Ile Phe Ser Ala Phe Val Gly Thr Ala
115 120 125
25 Leu Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Leu Val Ala Arg Arg Arg
130 135 140
30 Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Val Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu
145 150 155 160
30 Leu Trp Leu His Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Thr Ala Leu
165 170 175
35 Phe Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr Ile
180 185 190
40 Val Val Asp Thr Gln Glu Ile Val Glu Arg Ala His Leu Gly Asp Leu
195 200 205
40 Asp Tyr Val Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Leu Val Ala Val
210 215 220
45 Phe Val Arg Ile Leu Val Ile Met Leu Lys Asn Ser Thr Glu Arg Asn
225 230 235 240
45 Glu Lys Lys Lys Lys Arg Arg Asp
245

<210> 13

<211> 1510

<212> DNA

50 <213> Glycine max

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(777)

55 <223> coding for BI-1 protein

<400> 13

EP 2 081 954 B1

	atc	acg	aaa	act	ata	cga	ttc	gat	tcc	ttg	ttt	tcg	atg	gac	act	ttc	48
	Ile	Thr	Lys	Thr	Ile	Arg	Phe	Asp	Ser	Leu	Phe	Ser	Met	Asp	Thr	Phe	
	1				5					10					15		
5	ttc	aag	tcc	cca	tct	tct	tct	tct	tcg	aga	agc	cgc	tgg	agt	tac	gat	96
	Phe	Lys	Ser	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Arg	Ser	Arg	Trp	Ser	Tyr	Asp	
				20					25					30			
10	act	ctc	aag	aat	ttc	cgc	gag	atc	tct	ccg	ctc	gtt	cag	aat	cac	atc	144
	Thr	Leu	Lys	Asn	Phe	Arg	Glu	Ile	Ser	Pro	Leu	Val	Gln	Asn	His	Ile	
			35					40					45				
15	aaa	ctg	gtt	tat	ttt	acg	tta	tgt	tgc	gct	gtg	gtg	gct	gct	gct	gtt	192
	Lys	Leu	Val	Tyr	Phe	Thr	Leu	Cys	Cys	Ala	Val	Val	Ala	Ala	Ala	Val	
		50					55					60					
20	gga	gct	ttc	ctt	cat	gtt	ctg	tgg	aac	att	ggc	ggt	ttt	ctc	acc	acg	240
	Gly	Ala	Phe	Leu	His	Val	Leu	Trp	Asn	Ile	Gly	Gly	Phe	Leu	Thr	Thr	
	65				70					75						80	
25	ttg	gct	tcc	att	ggg	agc	atg	ttt	tgg	ttg	cta	tct	aca	ccc	cct	ttt	288
	Leu	Ala	Ser	Ile	Gly	Ser	Met	Phe	Trp	Leu	Leu	Ser	Thr	Pro	Pro	Phe	
					85					90					95		
30	gaa	gag	caa	aag	agg	ttg	tct	ctg	ttg	atg	gct	tcg	gcc	ctg	ttt	cag	336
	Glu	Glu	Gln	Lys	Arg	Leu	Ser	Leu	Leu	Met	Ala	Ser	Ala	Leu	Phe	Gln	
				100					105					110			
35	ggt	gct	tcc	att	gga	cct	ctg	att	gat	ttg	gct	ttt	gcc	att	gat	cct	384
	Gly	Ala	Ser	Ile	Gly	Pro	Leu	Ile	Asp	Leu	Ala	Phe	Ala	Ile	Asp	Pro	
			115					120					125				
40	ggc	ctt	atc	att	ggc	gca	ttt	gtg	gca	act	tct	ttg	gct	ttt	gct	tgc	432
	Gly	Leu	Ile	Ile	Gly	Ala	Phe	Val	Ala	Thr	Ser	Leu	Ala	Phe	Ala	Cys	
		130					135					140					

EP 2 081 954 B1

ttt tct gca gta gcc tta gtt gca agg cga agg gag tac ctc tac ctt 480
 Phe Ser Ala Val Ala Leu Val Ala Arg Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu
 145 150 155
 5 ggt ggt ttg ctt tct tct tgg ctt tcc att ctt atg tgg ttg cac tct 528
 Gly Gly Leu Leu Ser Ser Trp Leu Ser Ile Leu Met Trp Leu His Ser
 165 170
 gat tcc tct ctc ttt ggg ggc tca att gca ctc ttc aag ttt gag ctg 576
 Asp Ser Ser Leu Phe Gly Gly Ser Ile Ala Leu Phe Lys Phe Glu Leu
 180 185
 10 tac ttt ggg ctt ttg gtg ttt gtg ggc tac gtt ata gta gac act caa 624
 Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr Val Ile Val Asp Thr Gln
 195 200 205
 15 gaa att att gaa agg gct cac ttt ggt gac ctg gat tat gtg aag cat 672
 Glu Ile Ile Glu Arg Ala His Phe Gly Asp Leu Asp Tyr Val Lys His
 210 215 220
 gca ttg aca ttg ttc act gat ttg gct gca atc ttt gtg cga att ctt 720
 Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Leu Ala Ala Ile Phe Val Arg Ile Leu
 225 230 235
 20 att ata atg ttg aag aat tca tct gag aga aat gag aag aag aag aaa 768
 Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ser Glu Arg Asn Glu Lys Lys Lys Lys
 245 250 255
 25 agg aga gat tagtaggctg accgaccgac tcgagctcag gcttctctac 817
 Arg Arg Asp
 agtaatttag tttgtggaga atacataatt agctgttttag atgatgttgg tcccttggtg 877
 agttagttag ctatgtgttt gctgtaatgg taaatgtcag gatttctttt aaacatcttc 937
 30 atatgtattt gccaatatca taatgtgtcg tataacatca taccttgggtt taiaaaaaaaa 997
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaann nnnnnnnnnn 1057
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnngg tgtttgtggg ctacgttata 1117
 35 gtagacactc aagtaatcat tgagagggct cactttgggtg acctggatta tgtaagcat 1177
 gcattgacac tgttcactga tttggctgca atctttgtgc gaattcttaa tataatgttg 1237
 aataattcat ctaagagaaa tgagaagaag aggaggagag attaataagggt tgaccgattg 1297
 40 ctatgtgtag agtaatttgg tttgtagaga atacataatt agctgttttag aagttgttgg 1357
 tccccttgtg tagttagtag ttagctatgt gtttgctgta atggtaaagt tcaggatttc 1417
 ttttaaacat tttcatatgt atttgctaata aatcataata tatagtataa acatcattcc 1477
 45 ttggtttaa aaaagaaaa aaaaaaaaaa aaa 1510

<210> 14

<211> 259

<212> PRT

50 <213> Glycine max

<400> 14

55

EP 2 081 954 B1

Ile Thr Lys Thr Ile Arg Phe Asp Ser Leu Phe Ser Met Asp Thr Phe
 1 5 10
 Phe Lys Ser Pro Ser Ser Ser Ser Ser Arg Ser Arg Trp Ser Tyr Asp
 5 20 25 30
 Thr Leu Lys Asn Phe Arg Glu Ile Ser Pro Leu Val Gln Asn His Ile
 10 35 40 45
 Lys Leu Val Tyr Phe Thr Leu Cys Cys Ala Val Val Ala Ala Ala Val
 50 55 60
 Gly Ala Phe Leu His Val Leu Trp Asn Ile Gly Gly Phe Leu Thr Thr
 15 65 70 75 80
 Leu Ala Ser Ile Gly Ser Met Phe Trp Leu Leu Ser Thr Pro Pro Phe
 85 90 95
 Glu Glu Gln Lys Arg Leu Ser Leu Leu Met Ala Ser Ala Leu Phe Gln
 100 105 110
 Gly Ala Ser Ile Gly Pro Leu Ile Asp Leu Ala Phe Ala Ile Asp Pro
 115 120 125
 Gly Leu Ile Ile Gly Ala Phe Val Ala Thr Ser Leu Ala Phe Ala Cys
 130 135 140
 Phe Ser Ala Val Ala Leu Val Ala Arg Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu
 145 150 155 160
 Gly Gly Leu Leu Ser Ser Trp Leu Ser Ile Leu Met Trp Leu His Ser
 165 170 175
 Asp Ser Ser Leu Phe Gly Gly Ser Ile Ala Leu Phe Lys Phe Glu Leu
 180 185 190
 Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr Val Ile Val Asp Thr Gln
 195 200 205
 Glu Ile Ile Glu Arg Ala His Phe Gly Asp Leu Asp Tyr Val Lys His
 210 215 220
 Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Leu Ala Ala Ile Phe Val Arg Ile Leu
 225 230 235 240
 Ile Ile Met Leu Lys Asn Ser Ser Glu Arg Asn Glu Lys Lys Lys Lys
 245 250 255
 Arg Arg Asp

45 <210> 15
 <211> 651
 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum

50 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(651)
 <223> coding for BI-1 protein

55 <400> 15

EP 2 081 954 B1

5 gtc gca atg ccg ggt cga cga ttt cgt ctg acc tat gct ttg cct ggc 48
 Val Ala Met Pro Gly Arg Arg Phe Arg Leu Thr Tyr Ala Leu Pro Gly
 1 5 10 15
 5 ctc atc tgc cgt ggg tgc tta cct gca cat tgc cct gaa cat tgg cgg 96
 Leu Ile Cys Arg Gly Cys Leu Pro Ala His Cys Pro Glu His Trp Arg
 20 25 30
 10 gat gct gac aat gct cgc gtg tat cgg aac cat cgc ctg gat gtt ctc 144
 Asp Ala Asp Asn Ala Arg Val Tyr Arg Asn His Arg Leu Asp Val Leu
 35 40 45
 15 ggt gcc agt cta cga gga gag gaa gag gtt tgg gct gct gat ggg tgc 192
 Gly Ala Ser Leu Arg Gly Glu Glu Val Trp Ala Ala Asp Gly Cys
 50 55 60
 20 agc ctc ctg gaa ggg gct tca gtt gga cct ctg att gag ctt gcc ata 240
 Ser Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile
 65 70 75 80
 20 gac ttt gac cca agt atc ctc gtg aca ggg ttt gtc gga acc gcc atc 288
 Asp Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile
 85 90 95
 25 gcc ttc ggg tgc ttc tct ggc gcc gcc atc atc gcc aag cgc agg gag 336
 Ala Phe Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu
 100 105 110
 30 tac ctg tac ctc ggt ggt ctg ctc tcc tcc ggc ctg tcg atc ctg ctc 384
 Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu
 115 120 125
 30 tgg ctg cag ttt gcc acg tcc atc ttt ggc cac tcc tct ggc agc ttc 432
 Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe
 130 135 140
 35 atg ttt gag gtt tac ttt ggc ctg ttg atc ttc ctg gga tac atg gtg 480
 Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val
 145 150 155 160
 35 tac gac acg cag gag atc atc gag agg gcg cac cac ggc gac atg gat 528
 Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp
 165 170 175
 40 tac atc aag cac gcg ctc acc ctc ttc acc gac ttc gtc gcc gtt ctc 576
 Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu
 180 185 190
 45 gtc cgc gtc ctc atc atc ttg ctc aag aac gca gcg gac aag gtc gga 624
 Val Arg Val Leu Ile Ile Leu Leu Lys Asn Ala Ala Asp Lys Val Gly
 195 200 205
 45 ggc caa gaa gag gag gaa gag aag tcc 651
 Gly Gln Glu Glu Glu Glu Lys Ser
 210 215

<210> 16

50 <211> 217

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 16

55

EP 2 081 954 B1

Val₁ Ala Met Pro Gly₅ Arg Arg Phe Arg Leu₁₀ Thr Tyr Ala Leu Pro Gly₁₅
 5 Leu Ile Cys Arg₂₀ Gly Cys Leu Pro Ala₂₅ His Cys Pro Glu His₃₀ Trp Arg
 Asp Ala Asp₃₅ Asn Ala Arg Val Tyr₄₀ Arg Asn His Arg Leu₄₅ Asp Val Leu
 10 Gly Ala Ser Leu Arg Gly Glu₅₅ Glu Glu Val Trp Ala₆₀ Ala Asp Gly Cys
 Ser Leu Leu Glu Gly Ala₇₀ Ser Val Gly Pro Leu₇₅ Ile Glu Leu Ala Ile₈₀
 15 Asp Phe Asp Pro Ser₈₅ Ile Leu Val Thr Gly₉₀ Phe Val Gly Thr Ala Ile₉₅
 Ala Phe Gly Cys₁₀₀ Phe Ser Gly Ala Ala₁₀₅ Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu
 20 Tyr Leu Tyr₁₁₅ Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser₁₂₅ Ile Leu Leu
 Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser₁₃₅ Ile Phe Gly His Ser₁₄₀ Ser Gly Ser Phe
 25 Met Phe Glu Val Tyr Phe₁₅₀ Gly Leu Leu Ile Phe₁₅₅ Leu Gly Tyr Met Val₁₆₀
 Tyr Asp Thr Gln Glu₁₆₅ Ile Ile Glu Arg Ala₁₇₀ His His Gly Asp Met Asp₁₇₅
 30 Tyr Ile Lys His₁₈₀ Ala Leu Thr Leu Phe₁₈₅ Thr Asp Phe Val Ala₁₉₀ Val Leu
 Val Arg Val₁₉₅ Leu Ile Ile Leu Leu₂₀₀ Lys Asn Ala Ala Asp₂₀₅ Lys Val Gly
 35 Gly Gln Glu Glu Glu Glu₂₁₅ Lys Ser

<210> 17
 <211> 412
 <212> DNA
 40 <213> Zea mays

<220>
 <221> CDS
 <222> (3)..(410)
 45 <223> coding for B11-protein

<400> 17

50

55

EP 2 081 954 B1

	tt gtt att gac ttg gat tcg agg att ctc gtc act gcg ttc gtc ggg	47
	Val Ile Asp Leu Asp Ser Arg Ile Leu Val Thr Ala Phe Val Gly	
	1 5 10 15	
5	acc gca gtt gct ttt gca tgc ttc tct ggc gct gcc atc atc gcc aag	95
	Thr Ala Val Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys	
	20 25 30	
10	cgc agg gaa tac ctg tac ctc ggc ggt ctg ctt tca tct ggc ctc tcc	143
	Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser	
	35 40 45	
15	att ctt ctc tgg ctg cag ttt gct act tca atc ttt ggc cac acc agc	191
	Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Thr Ser	
	50 55 60	
20	gcg acc ttc atg ttt gag ctc tac ttt ggc ctc ctg gtt ttc ctg gga	239
	Ala Thr Phe Met Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Leu Gly	
	65 70 75	
25	tat atg gtg ttt gac acc cag gag atc atc gag agg gcg cac cgt ggg	287
	Tyr Met Val Phe Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His Arg Gly	
	80 85 90 95	
30	gac atg gac tac atc aag cac gcg ctg act ctc ttc acc gac ttt gtt	335
	Asp Met Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val	
	100 105 110	
35	gcg gtt ctt gtt cga atc ctt gtc atc atg atg aag aat gca cag gag	383
	Ala Val Leu Val Arg Ile Leu Val Ile Met Met Lys Asn Ala Gln Glu	
	115 120 125	
40	aaa tcc caa gac gag aag aag agg aag aa	412
	Lys Ser Gln Asp Glu Lys Lys Arg Lys	
	130 135	

<210> 18
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Zea mays
 <400> 18

EP 2 081 954 B1

Val Ile Asp Leu Asp Ser Arg Ile Leu Val Thr Ala Phe Val Gly Thr
 1 5 10 15
 Ala Val Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg
 5 20 25 30
 Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile
 35 40 45
 Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Thr Ser Ala
 10 50 55 60
 Thr Phe Met Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Leu Gly Tyr
 65 70 75 80
 Met Val Phe Asp Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His Arg Gly Asp
 15 85 90 95
 Met Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala
 100 105 110
 Val Leu Val Arg Ile Leu Val Ile Met Met Lys Asn Ala Gln Glu Lys
 20 115 120 125
 Ser Gln Asp Glu Lys Lys Arg Lys
 130 135

<210> 19
 <211> 345
 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(342)

<400> 19

gcc gcc atc atc gcc aag cgc agg gag tac ctg tac ctc ggt ggc ctg 48
 Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu
 1 5 10 15
 ctc tcc tcc ggc ctg tcg atc ctg ctc tgg ctg cag ttt gcc acg tcc 96
 Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser
 20 25 30
 atc ttt ggc cac tcc tct ggc agc ttc atg ttt gag gtt tac ttt ggc 144
 Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly
 35 40 45
 ctg ttg atc ttt ctg gga tac atg gtg tac gac acg cag gag atc atc 192
 Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile
 50 55 60
 gag agg gcg cac cac ggc gac atg gac tac atc aag cac gcg ctc acc 240
 Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr
 65 70 75 80

55

EP 2 081 954 B1

```

ctc ttc acc gac ttt gtc gcc gtc ctc gtc cgg atc ctc atc atc atg 288
Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg Ile Leu Ile Ile Met
      85                      90                      95

5    ctc aag aac gca ggc gac aag tcg gag gac aag aag aag agg aag agg 336
Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys Lys Lys Arg Lys Arg
      100                      105                      110

agg tcc tga 345
Arg Ser

10
<210> 20
<211> 114
<212> PRT
<213> Triticum aestivum

15
<400> 20

20    Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu
      1      5                      10

Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Thr Ser
      20                      25                      30

Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly
      35                      40                      45

25    Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp Thr Gln Glu Ile Ile
      50                      55                      60

Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile Lys His Ala Leu Thr
      65                      70                      75

30    Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg Ile Leu Ile Ile Met
      85                      90                      95

Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys Lys Lys Arg Lys Arg
      100                      105                      110

35    Arg Ser

<210> 21
<211> 403
40    <212> DNA
<213> Zea mays

<220>
<221> CDS
45    <222> (1)..(402)
<223> coding for B11-protein

<400> 21

50

55

```

EP 2 081 954 B1

5 ggc agc atc gcc tgg ctc ttc tcg gtg ccc gtc tac gag gag agg aag 48
 Gly Ser Ile Ala Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys
 1 5 10 15
 5 agg tac tgg ctg ctg atg gcg gct gcc ctc ctg gaa ggg gcg tcg gtt 96
 Arg Tyr Trp Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val
 20 25 30
 10 gga ccc ctc atc aag ctc gcc gtg gaa ttt gac cca agc atc ctg gtg 144
 Gly Pro Leu Ile Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val
 35 40 45
 15 aca gcg ttc gtg ggg act gcc att gcg ttc gcg tgc ttc tct tgc gcg 192
 Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Cys Ala
 50 55 60
 20 gcc atg gtg gcc aag cgc agg gag tac ctc tac ctg gcc ggg ctg ctc 240
 Ala Met Val Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu
 65 70 75 80
 25 tct tct ggc ctc tcc atc ctg ctc tgg ctg cag ttc gcc gcc tcc atc 288
 Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Phe Ala Ala Ser Ile
 85 90 95
 30 ttc ggc cac caa tcc act agc agc ttc atg ttt gag gtc tac ttt ggg 336
 Phe Gly His Gln Ser Thr Ser Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly
 100 105 110
 35 ctg ctc atc ttc ctg gcc tac atg gtg tac gac acg cag gag gtc atc 384
 Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp Thr Gln Glu Val Ile
 115 120 125
 40 gag agg gcg cac cac gcc g 403
 Glu Arg Ala His His Gly
 130

<210> 22

<211> 134

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 22

EP 2 081 954 B1

1 Gly Ser Ile Ala Trp₅ Leu Phe Ser Val Pro₁₀ Val Tyr Glu Glu Arg Lys
 5 Arg Tyr Trp Leu₂₀ Leu Met Ala Ala Ala₂₅ Leu Leu Glu Gly Ala₃₀ Ser Val
 Gly Pro Leu₃₅ Ile Lys Leu Ala Val₄₀ Glu Phe Asp Pro Ser₄₅ Ile Leu Val
 10 Thr Ala Phe Val Gly Thr Ala₅₅ Ile Ala Phe Ala Cys₆₀ Phe Ser Cys Ala
 Ala Met Val Ala Lys Arg₇₀ Arg Glu Tyr Leu Tyr₇₅ Leu Gly Gly Leu Leu₈₀
 15 Ser Ser Gly Leu Ser₈₅ Ile Leu Leu Trp Leu₉₀ Gln Phe Ala Ala Ser Ile
 Phe Gly His Gln₁₀₀ Ser Thr Ser Ser₁₀₅ Phe Met Phe Glu Val Tyr₁₁₀ Phe Gly
 20 Leu Leu Ile₁₁₅ Phe Leu Gly Tyr Met₁₂₀ Val Tyr Asp Thr Gln₁₂₅ Glu Val Ile
 Glu Arg Ala His His Gly
 130

25 <210> 23
 <211> 410
 <212> DNA
 <213> Zea mays

30 <220>
 <221> CDS
 <222> (3)..(410)
 <223> coding for B11-protein

35 <400> 23

40

45

50

55

EP 2 081 954 B1

gc tgg aac atc ggc gtg agg ctg aca atg ctc ggt tgc atc ggc agc 47
 Trp Asn Ile Gly Val Arg Leu Thr Met Leu Gly Cys Ile Gly Ser
 1 5 10 15

5 atc gac tgg ctc ttc tcg gtg ccc gtc tac gag gag agg aag agg tat 95
 Ile Asp Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Tyr
 20 25 30

10 ggg ctg ctg atg gcg gct gcc ctc ctg gaa ggc gct tcg gtc gga ccc 143
 Gly Leu Leu Met Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro
 35 40 45

15 ctc gtc aag ctc gcc gtg gaa ttt gac cca agc atc ctg gtg acg gcg 191
 Leu Val Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Ala
 50 55 60

20 ttc gtg ggg act gcc atc gcg ttc gcg tgc ttc tcc ggc gcg gcc atg 239
 Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Met
 65 70 75

25 gtg gcc agg cgc agg gag tac ctc tac ctg ggc ggg ctg ctc tcg tcg 287
 Val Ala Arg Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser
 80 85 90 95

30 ggg ctc tcc atc ctg ctc tgg ctg cag ctc gcc gcc tcc atc ttc ggc 335
 Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Leu Ala Ala Ser Ile Phe Gly
 100 105 110

35 cac tcc gca acc agc ttc atg ttc gag gtc tac ttc ggg ctg ctc atc 383
 His Ser Ala Thr Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile
 115 120 125

40 ttc ctg ggc tac gtg gtg tac gac acg 410
 Phe Leu Gly Tyr Val Val Tyr Asp Thr
 130 135

<210> 24
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Zea mays

<400> 24

Trp Asn Ile Gly Val Arg Leu Thr Met Leu Gly Cys Ile Gly Ser Ile
 1 5 10 15

40 Asp Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Tyr Gly
 20 25 30

45 Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu
 35 40 45

50 Val Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Ala Phe
 50 55 60

55 Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Met Val
 65 70 75 80

Ala Arg Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly
 85 90 95

Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu Gln Leu Ala Ala Ser Ile Phe Gly His
 100 105 110

55 Ser Ala Thr Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe
 115 120 125

Leu Gly Tyr Val Val Tyr Asp Thr

EP 2 081 954 B1

130

135

5
 <210> 25
 <211> 463
 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum

10
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(462)
 <223> coding for B11-protein

15
 <400> 25

	ttc tca ggt acg ttc cgc aat tcc cgg agc gac gat ttc gtg ctc tgc	48
	Phe Ser Gly Thr Phe Arg Asn Ser Arg Ser Asp Asp Phe Val Leu Cys	
	1 5 10 15	
20	gaa ctt cag cga gag ctc ccc cga tgc cgg gac gca acc ttg acg gtc	96
	Glu Leu Gln Arg Glu Leu Pro Arg Cys Arg Asp Ala Thr Leu Thr Val	
	20 25 30	
25	gta tac gtg atc cca ata gtg ggc cga ata aaa tct gcc gcg ggt gct	144
	Val Tyr Val Ile Pro Ile Val Gly Arg Ile Lys Ser Ala Ala Gly Ala	
	35 40 45	
30	tac ctg cac att gcc ctg aac atc ggt ggg atg ctg aca atg ctt gcg	192
	Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu Thr Met Leu Ala	
	50 55 60	
35	tgt atc gga acc att gcc tgg atg ttc tct gtg cca gtc tat gag gag	240
	Cys Ile Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu	
	65 70 75 80	
40	agg aag agg ttt ggg ctg ctg atg ggt gca gcc ctc ctg gaa ggg gct	288
	Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala	
	85 90 95	
45	tcg gtt gga cct ctg att gag ctt gcc ata gac ttt gac cca agc atc	336
	Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe Asp Pro Ser Ile	
	100 105 110	
50	ctc gtg aca ggg ttt gtt gga acc gcc atc gcc ttt ggg tgc ttc tct	384
	Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Gly Cys Phe Ser	
	115 120 125	
55	ggc gcc gcc atc atc gcc aag cgc agg gag tac ctg tac ctc gga ggc	432
	Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly	
	130 135 140	
60	ctg ctc tcc tcc ggc ctg acg atc ctg ctc t	463
	Leu Leu Ser Ser Gly Leu Thr Ile Leu Leu	
	145 150	

50
 <210> 26
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

55
 <400> 26

EP 2 081 954 B1

Phe Ser Gly Thr Phe Arg Asn Ser Arg Ser Asp Asp Phe Val Leu Cys
 1 5 10 15
 5 Glu Leu Gln Arg Glu Leu Pro Arg Cys Arg Asp Ala Thr Leu Thr Val
 20 25 30
 Val Tyr Val Ile Pro Ile Val Gly Arg Ile Lys Ser Ala Ala Gly Ala
 10 35 40 45
 Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu Thr Met Leu Ala
 50 55 60
 15 Cys Ile Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu
 65 70 75 80
 Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala
 85 90 95
 20 Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe Asp Pro Ser Ile
 100 105 110
 Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Gly Cys Phe Ser
 115 120 125
 25 Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly
 130 135 140 145
 Leu Leu Ser Ser Gly Leu Thr Ile Leu Leu
 150

30 <210> 27
 <211> 388
 <212> DNA
 <213> Zea mays

35 <220>
 <221> CDS
 <222> (3)..(386)
 <223> coding for B11-protein

40 <400> 27

45

50

55

EP 2 081 954 B1

tc tgg aac atc ggc ggg acg ctg aca atg ctc ggt tgc gtc ggc agc 47
 Trp Asn Ile Gly Gly Thr Leu Thr Met Leu Gly Cys Val Gly Ser 15
 1 5 10

5 atc gcc tgg ctc ttc tcg gtg ccc gtc tac gag gag agg aag agg tat 95
 Ile Ala Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Tyr 30
 20

10 ggg ctg ctg atg gcg gct gcc ctc ctg gaa ggc gct tcg gtc gga ccc 143
 Gly Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro 45
 35 40

15 ctc gtc aag ctc gcc gtg gaa ttt gac cca agc atc ctg gtg acg gcg 191
 Leu Val Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Ala 60
 50 55 60

20 ttc gtg ggg act gcc atc gcg ttc gcg tgc ttc tcc ggc gcg cca tgg 239
 Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Pro Trp 65 70 75
 70

25 tgg cag gcc agg gag tac ctc tac ctg ggc ggc tgc tct cgt cga ggc 287
 Trp Gln Ala Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Cys Ser Arg Arg Gly 80 85 90 95
 80

30 tct cca tcc tgc tct ggc tgc agc tcg ccg cct cca tct tcg gca ctc 335
 Ser Pro Ser Cys Ser Gly Cys Ser Ser Pro Pro Pro Ser Ser Ala Leu 100 105 110
 100

35 cgc aac agc ttc atg ttc gag gtc tac ttc ggg ctg ctc att ctt ctg 383
 Arg Asn Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Leu Leu 115 120 125
 115 120 125

ggc ta 388

30 Gly

<210> 28

<211> 128

35 <212> PRT

<213> Zea mays

<400> 28

40 Trp Asn Ile Gly Gly Thr Leu Thr Met Leu Gly Cys Val Gly Ser Ile 15
 1 5 10

45 Ala Trp Leu Phe Ser Val Pro Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Tyr Gly 30
 20 25 30

50 Leu Leu Met Ala Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu 45
 35 40 45

55 Val Lys Leu Ala Val Glu Phe Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Ala Phe 60
 50 55 60

60 Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Pro Trp Trp 80
 65 70 75 80

65 Gln Ala Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Cys Ser Arg Arg Gly Ser 95
 85 90 95

70 Pro Ser Cys Ser Gly Cys Ser Ser Pro Pro Pro Ser Ser Ala Leu Arg 110
 100 105 110

75 Asn Ser Phe Met Phe Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Leu Leu Gly 125
 115 120 125

EP 2 081 954 B1

<210> 29
 <211> 1737
 <212> DNA
 <213> Solanum tuberosum

5

<220>
 <221> promoter
 <222> (1)..(1737)
 <223> patatin promotor

10

<400> 29

15 aagccttatgt tgccatatag agtagtttgt gatggtatac ttcataaact ttaacttatg 60
 ttaaatttgt aatgataaaa tttttattgt aaattaaaaa ttacttataa aattgggcat 120
 tataacatat gaaagacaaa ttgtgttaca tattttactt ttgactttaa tatgaatatt 180
 tcaattttaa tcattgtttt attttctctt tccttttaca ggtataaaag gtgaaaattg 240
 aagcaagatt gattgcaagc tatgtgtcac cacgttattg aacttttggg agaaattttt 300
 acttatatgt ctttgtttag gagtaatatt tgatatgttt tagtttagatt ttcttgtcat 360
 ttatgcttta gtataatfff agttatffff attatatgat catgggtgaa ttttgataca 420
 aatatttttg tcattaaata aattaatffa tcacaacttg attactttca gtgacaaaaa 480
 20 atgtattgtc gtagtaccct tttttgttga atatgaataa ttttttttat tttgtgacaa 540
 cactacttat gataatattt agtgacatat atgtcgtcgg taaaagcaaa 600
 cactttcagt gacaaaataa tagatttaat cacaaaatta ttaacccttt ttataataat 660
 aaatztatcc ctaatttata catttaagga caaagtattt tttttatata taaaaaatag 720
 tcttttagtga cgatcgtagt gttgagtcta gaaatcataa tgttgaaatc agaaaaatct 780
 catgcagtgt aaaataaacc tcaaaaagga cgttcagtcc atagaggggg tgtatgtgac 840
 25 accccaacct cagcaaaaaga aaacctccct tcaacaagga catttgcggt gctaaacaat 900
 ttcaagtctc atcacacata tttttattat ataatactaa taaagaatag aaaaggaaag 960
 gtaaacatca ttaaatcgtc tttgtatatt tttagtgaca actgattgac gaaatctttt 1020
 tcgtcacaca aaatttttag tgacgaaaca tgatttatag atgatgaaat tttttgtccc 1080
 tcataatcta atttgttga gtgatcatta ctctttgtt tgttttattt gtcattgtag 1140
 tccatttaaaa aaaaatatct ctcttcttat gtacgtgaat gggttgaacg gatctattat 1200
 30 ataatactaa taaagaatag aaaaaggaaa gtgagtgagg ttcgagggag agaactctgtt 1260
 taatatcaga gtcgatcatg tgtcaatfff atcgatatga ccctaacttc aactgagttt 1320
 aaccaattcc gataaggcga gaaatatcat agtattgagt ctagaaaaat ctcatgtagt 1380

35 gtggggtaaa cctcagcaag gacgttgagt ccatagaggg ggggtgatgt gacaccccaa 1440
 cctcagcaaa agaaaacctc ccctcaagaa ggacatttgc ggtgctaaac aatttcaagt 1500
 ctcatcacac atatatatat attatataat actaataaat aatagaaaaa ggaaaggtaa 1560
 acatcactaa cgacagttgc ggtgcaaaact gagtgaggta ataaacatca ctaactttta 1620
 ttggttatgt caaactcaaa gtaaaatffc tcaacttgtt tacgtgccta tatataccat 1680
 gcttgttata tgctcaaagc accaacaaaa ttttaaaaaca ctttgaacat ttgcaaaa 1737

40

<210> 30
 <211> 1317
 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum

45

<220>
 <221> promoter
 <222> (1)..(1317)
 <223> germin 9f-3.8 gene promotor

50

<400> 30

55

EP 2 081 954 B1

5
10
15
20

gaattcaagc	tatcactctc	gaaccaagca	cattgatgta	aggtatcatt	ggattccaga	60
tgctcgtgagt	tccaagttgc	tgaacttga	gaagatccat	accgacgaca	atgggtccaga	120
tatgatgacc	aagatattgc	gaaataagaa	gctacaagca	tggtgcaagg	tagcgggcat	180
ggcggtgccc	ccatcatgag	tccggagggg	agatttggtg	ggatatacctc	ctcatgtggg	240
ttctgaggag	atgaccattt	gaggcctttt	agccagccca	aagaggtgca	gaagcccact	300
accatttagg	gttatgacct	agggtcattt	tggactttgc	acatgagtgg	atggggatgc	360
tttaccctcc	atccagcagc	caccaccaag	ggtgacgaaa	atcagttcat	cctccaagag	420
agaagaagag	agaaaaccaa	gagagcaagg	gaagaagagg	aagattgaag	gaagaagaaa	480
agggagctcc	tcccaagggt	tgtgatggtc	catatccact	atcttgtctc	cttcaactt	540
cggttccacc	atctttggta	agattgttct	aatccctagt	tcttgagccc	caaatcttgt	600
tgtgttcac	caagattcag	aaatcttgat	gtatgagatc	ctctagtgct	gtctagagaa	660
gaatttggtg	tatccacat	ttgataatag	tggaagagga	tttgggtggc	ttcggcccat	720
ggtttttccc	ctcaagttga	ggggttttcc	acgtaaaatc	tggtgtctct	ttgttgatgc	780
ttgggtggtg	ccagaaactt	actcctacca	caagacacta	ggggccagtt	cttttgggaa	840
attctcccag	aattgaccct	ctccccagct	tctcccagaa	ttgtcactcc	atctttcttt	900
acaattccta	gctagttaag	gtctaattag	ttaggaattg	taaaaaata	tcaagtggca	960
attctgggag	aagctgggga	gggggtcaat	tctggaagaa	ttgcccataa	gaactggccc	1020
taggctgagg	agtgtcttgc	ctgctgctta	acattttctg	cctccatata	tggtgtgca	1080
tatgtttctt	tccgtgctaa	gcaacgatcc	ttgagttagt	acatgatgtg	gtgctgagat	1140
tactttggtt	tcgctgcagt	tatcagttaa	ccacaagtgc	atgtgcgtgc	taattcccaa	1200
caatatgcca	cccgcaactc	atccaccata	gctcagcagc	aaccaccaat	gccatagaca	1260
ctctcggtaa	acaacctgta	gcttatcagt	ctagctaagc	gtgctgcata	gcaagca	1317

<210> 31
<211> 959
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<220>
<221> promoter
<222> (1)..(959)
<223> CAB-2 promotor

<400> 31

35
40
45

gaattcatgt	gtgagggcaa	ttagtgattg	taaaaataaa	attgtgtttt	gtaaaaaact	60
tttactgtcg	aaattattta	gggtgatgaa	aaaatcagta	aactacgaat	gatagcttaa	120
agagtttcta	tcaaagtgat	tgaggaatag	tttgttgcaa	attaaacctc	taacaaaatg	180
tttctgtttg	tggtttttca	tctctacaaa	ttttgaattt	tatgatgaat	tagaaagata	240
gaatgagtta	cttttagattt	taaaagggtg	ttcaagttta	caaaacagat	tactagaatc	300
atgattaaaa	atttacaagc	tacataattg	ctaaaccaat	gatgttgac	ataccagatg	360
atagtttttc	agtgtttgaa	caatcaattg	gatagttttt	atgtttctgc	aaaatatgca	420
aataatcagt	gtttttgagt	ctttgcattt	tgatttataa	gcaaaaacaa	ctgagtttca	480
aggttaaatt	aattacatta	ttcatgagat	ttatcagggt	agtggataaa	ctgacaatgg	540
aatcaatggt	attgtaaatt	ggtagtgatg	ttggacttct	aatgttactc	tctatgatgt	600
ttcggtcac	ggtatcacac	tatctttact	tttattttaa	ggaaagatca	cacaaataag	660
ttatctctat	tcagaactat	taagctgctt	ccaaaagact	tgcaacatgt	ggctctgaaa	720
tgctttggct	gcaatgaaaa	aatcatagca	aaagctagtg	gactagagac	tgccacataa	780
gaatagtaaa	cgttaaaacc	aaaatctcaa	aaatccaatg	agtaaagaga	tatagattac	840
ttcatagata	acaaacgtta	ctcgcaattt	tcctatataa	tccaacccta	cctaaccatt	900

ttcaatcact ctcactcaca agttagtcac caaaaaaaaa aaaaacacaa aaagtttca 959

<210> 32
<211> 445
<212> DNA
<213> Zea mays

<220>
<221> promoter
<222> (1)..(445)
<223> PPCZm1 promoter

EP 2 081 954 B1

<400> 32

5 gaattccaaa aatagacacg gcaatthttct tattcacaga aaaaatataa ctacaactaa 60
 tccccaagtc cacagggatt agggatcaat ctgcaaaact aaaagtactt ttacagttgt 120
 acttgcatg agtcatgtga ccatgagaga ggcgcacggt tcagcaaagc aacataaaaat 180
 tctccaaaacg ggccccgcca cacacgatca ccatcacccc cgggctcccg acccagtaca 240
 aatagacacg cacactccca actccccacc catctccgcc gcgcacaccg cccaatcagc 300
 caatctcctc ctctctctcc gctctcagac gagcagcggg tgccatcact ctccacttcc 360
 cacgccccgt gcgggctcgc aggcggcaga gaattgtctg tgccgccggg tgggaatttg 420
 attcggtcgg attccgtgcg ccgcg 445

<210> 33

<211> 5455

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: recombinant expression vector pUbiBI-1

<400> 33

20 ggggatcctc tagagtcgac ctgcaggcgg ccgcaactagt gattaggatt ccaacgcgag 60
 ccaggacaag cgaggaacct tgcgtgacgg gcgaggccgc cccgctccga ttcgattcga 120
 cgcgacggcg caggcgacgg gatggacgcc ttctactcga cctcgtcggc ggcggcgagc 180
 ggctggggcc acgactccct caagaacttc cgccagatct cccccgccgt gcagtcccac 240
 25 ctcaagctcg ttacctgac tctatgcttt gcactggcct catctgccgt ggggtcttac 300
 ctacacattg ccctgaacat cggcgggatg ctgacaatgc tcgcttgtgt cggaaactatc 360
 gcctggatgt tctcggtgcc agtctatgag gagaggaaga ggtttgggct gctgatgggt 420
 gcagccctcc tggaaagggc ttcggttgga cctctgattg agcttgccat agactttgac 480
 ccaagcatcc tcgtgacagg gtttgcgga accgccatcg ctttggggtg cttctctggc 540
 gccgccatca tcgccaaagc cagggagtac ctgtacctcg gtggcctgct ctgctctggc 600
 30 ctgtcgatcc tgccttggtc gcagtttgtc acgtccatct ttggccactc cttctggcagc 660
 ttcagttttg aggtttactt tggcctggtg atcttcttgg ggtacatggt gtacgacagc 720
 caggagatca tcgagagggc gcaccatggc gacatggact acatcaagca cgccctcacc 780
 ctcttcaccg actttgttgc cgtcctcgtc cgagtcctca tcatcatgct caagaacgca 840
 ggcgacaagt cggaggacaa gaagaagagg aagagggggg cctgaacgtw tctcccgcac 900
 atgtagatac cgtcaccgcy tcgacctgca ggcatgcccg ctgaaatcac cagtctctct 960
 35 ctacaaatct atctctctca taataatgty tgagttagtt ccagataagg gaattagggt 1020
 tcttataggg tttcgctcat gtgttgagca tataagaaac ctttagtatg tattttgtatt 1080
 tgtaaaatac ttctatcaat aaaatthtcta attcctaaaa ccaaaatcca gtgggtaccg 1140
 agctcgaatt caagcttggc actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct 1200
 ggcgttacc aacttaatcg ccttgcagca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc 1260
 gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcyca gcctgaatgg cgaatggcg 1320
 40 ctgatgcygt atthtctct tacgcatctg tgcggtatth cacaccgcat atgggtgact 1380
 ctcagtacaa tctgctctga tgcgcatag ttaagccagc cccgacacc gccaacacc 1440
 gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca agctgtgacc 1500
 gctcgcggga gctgcatgtg tcagaggtht tcaccgtcat caccgaaacg cgcgagacga 1560
 aagggcctcg tgatacgcct atthttatag gttaatgtca tgataataat ggttcttag 1620
 acgtcaggtg gcactthtctg gggaaatgtg cgcggaacc cthttgttt atthttctaa 1680
 45 atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat 1740
 tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgctg cccttattcc cthttttgcy 1800
 gcattthtgc thctgttht tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa 1860
 gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaaactggatc tcaacagcgg taagatcctt 1920
 gagagthtct gccccgaaga acgthttcca atgatgagca cthttaaagt tctgctatgt 1980
 ggcgcggtat tatcccgtat tgacgccggg caagagcaac tcggctcgcg catacactat 2040
 50 tctcagaatg acttggttga gtactacca gtcacagaaa agcatcttac ggtggcatg 2100

EP 2 081 954 B1

```

acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataactgc ggccaactta 2160
cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaa catgggggat 2220
catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag 2280
cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttg gcaaactatt aactggcgaa 2340
ctacttactc tagcttccc gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca 2400
ggaccacttc tgcgctcggc cttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc 2460
ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gactggggc cagatggtaa gccctcccg 2520
atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc 2580
gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tgtaactgt cagaccaagt ttactcatat 2640
atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt 2700
tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac 2760
cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgctg aatctgctgc 2820
ttgcaacaaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt tgccggatca agagctacca 2880
actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgttcttcta 2940
gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag caactctgtag caccgcctac atacctcgct 3000
ctgctaattc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg 3060
gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg ggttcctgctg 3120
acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagctt 3180
tgagaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg 3240
gtcggaaacg gagagcgcac gagggagcct ccagggggaa agcctggta tctttatagt 3300
cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg 3360
cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg 3420
ccttttgctc acatgttctt tcctgcgcta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc 3480
gcctttgtag gagctgatac cgctgcggc acatgcttag cggagcgcag cggatcagtg 3540
agcgaggaa ggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcy ttggccgatt 3600
cattaatgca gctggcacga caggtttccc gactggaaag cgggcagtga gcgcaacgca 3660
attaatgtga gttagctcac tcattaggca cccaggctt tacactttat gcttccggct 3720
cgtatgttgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca caggaaacag ctatgaccat 3780
gattacgaat tcccattgct cgaggatcta acatgcttag atacatgaag taacatgctg 3840
ctacggttta ataattcttg agttgatttt tactggtact tagatagatg tatatacatg 3900
cttagataca tgaagtaaca tgctcctaca gttcctttaa tcattattga gtacctatat 3960
attctaataa atcagtatgt tttaaattat ttgatttta ctggtactta gatagatgta 4020
tatatacatg ctcaaactatg cttagataca tgaagtaaca tgctgctacg gtttagtcat 4080
tattgagtc ctataatttc taataaatca gatgtttta aattattttg attttactgg 4140
tacttagata gatgtatata tacatgctca aacatgctta gatacatgaa gtaatatgct 4200
actacggttt aattgttctt gagtacctat atattcta ataatcagtat gttttaaatt 4260
atctcgatt tactggtact tagatagatg tatatataca tgcttagata catgaagtaa 4320
tagctacta cggtttaatt gttcttgaat acctataata tctaataaat cagtatgttt 4380
taaattttt ggtactttag tagatgtata tatacatgct tacaatgct cgaacatgct 4440
tagatacatg aagtaacatg ctacatata attataataa atcagtatgt cttaaattat 4500
tttgatttta ctggtactta gatagatgta tatacatgct caaacatgct tagatacatg 4560
aagtaacatg ctactacgg ttaatcatta ttgagtacct atatatctta ataaatcagt 4620
atgttttcaa ttgttttgat tttactggta cttagatata tgtatatata catgctcgaa 4680
catgctttag tacgtgaagt aacatgctac tatggttaat tgttcttgag tacctatata 4740
ttctaataaa tcagtatggt ttaaattatt tcgattttac tggctacttag atagatgta 4800
atatacatgc tcgaacatgc ttagatacat gaagtaacat gctactacgg tttaatcgtt 4860
cttgagtacc tataatctt aataaatcag tatgtcttaa attatcttga ttttactggt 4920
acttagatag atgtatatac atgcttagat acatgaagta acatgctact atgattta at 4980
cgttcttgag tacctatata ttctaataaa tcagtatggt ttttaattatt ttgattttac 5040
tggctacttag atagatgta atatacatgc tcgaacatgc ttagatacat gaagtaacat 5100
gctactacgg tttaatcatt cttgagtacc tatatattct aataaatcag tatgttttta 5160
attattttga tattactggt acttaacatg tttagataca tcatatagca tgcacatgct 5220
gctactgttt aatcattcgt gaatacctat atattcta atatcagtat gtcttcta at 5280
tattatgatt ttgatgtact tgtatggtgg catatgctgc agctatggt agattttgaa 5340
taccagtggt gatgagcatg catggcgcct tcatagttca tatgctgttt atttcctttg 5400
agactgttct tttttgttga tagtcaccct gttgtttggt gattcttatg cacc 5455

```

<210> 34

<211> 12633

50 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: recombinant expression vector pLo114ubiBI-1

55

<400> 34

EP 2 081 954 B1

aattcactgg ccgtcgtttt acaacgactc agagcttgac aggaggcccg atctagtaac 60

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

EP 2 081 954 B1

	atagatgaca	ccgcgcgcga	taatttatcc	tagtttgcgc	gctatatttt	gttttctatc	120
	gcgtattaaa	tgtataattg	cgggactcta	atcataaaaa	cccattctcat	aaataacgct	180
	atgcattaca	tgtaattat	tacatgctta	acgtaattca	acagaaatta	tatgataatc	240
	atcgcaagac	cggcaacagg	attcaatctt	aagaaacttt	attgccaat	gtttgaacga	300
5	tcggggatca	tccgggtctg	tggcgggaac	tccacgaaaa	tatccgaacg	cagcaagatc	360
	tagagcttgg	gtcccgcctca	gaagaactcg	tcaagaaggc	gatagaaggc	gatgcgctgc	420
	gaatcgggag	cggcgatacc	gtaaagcacg	aggaagcggg	cagcccattc	gccgccaagc	480
	tcttcagcaa	tatcacgggt	agccaacgct	atgtcctgat	agcggctccg	cacaccagc	540
	cggtcagagt	cgatgaatcc	agaaaagcgg	ccattttcca	ccatgatatt	cggcaagcag	600
	gcatcgccat	gggtcacgac	gagatcctcg	ccgtcgggca	tgcgcgcctt	gagcctggcg	660
10	aacagttcgg	ctggcgcgag	cccctgatgc	tcttcgtcca	gatcatcctg	atcgacaaga	720
	ccggcttcca	tccgagtagc	tgctcgtctg	atgctgatgt	tgcgttggg	gtcgaatggg	780
	caggtagccg	gatcaagcgt	atgcagccgc	cgatttgc	cagccatgat	ggatactttc	840
	tcggcaggag	caaggtgaga	tgacaggaga	tccgtccccg	gcacttcgcc	caatagcagc	900
	cagtcccttc	ccgcttcagt	gacaacgctg	agcacagctg	cgcaaggaac	gcccgctcgtg	960
	gccagccacg	atagccgcgc	tgctcgtctc	tgcaagtcat	tcaaggcacc	ggacaggtcg	1020
15	gtcttgacaa	aaagaaccgg	ggcgccctgc	gtgacagcc	ggaacacggc	ggcatcagag	1080
	cagccgattg	tctgttgtgc	ccagtcatag	ccgaatagcc	tctccaccac	agcggccgga	1140
	gaacctgcgt	gcaatccatc	ttgttcaatc	atgctgaaacg	atccagatcc	gtgtcagatt	1200
	atgttgattg	agagtgaata	tgagactcta	attggatacc	gaggggaatt	tatggaacgt	1260
	cagtggagca	tttttgacaa	gaaatatttg	ctagctgata	gtgaccttag	gcgacttttg	1320
	aacgcgcaat	aatggtttct	gacgtatgtg	cttagctcat	taaactccag	aaaccgcggg	1380
20	ctgagtggtc	ccttcaacgt	tgcggttctg	tcagttccaa	acgtaaaacg	gctgtgtccc	1440
	cgtcactggc	gggggtcata	acgtgactcc	cttaattctc	cgctcatgat	cagattgtcg	1500
	tttccgcctc	tcagtttaaa	ctatcagtg	ttgacaggat	cctgcttgg	aataattgtc	1560
	attagattgt	ttttatgcat	agatgcactc	gaaatcagcc	aatttttagac	aagtatcaaa	1620
	cggatgttaa	ttcagtagat	taaagacgct	cgcaatgtgt	tattaagtgt	tctaagcgtc	1680
	aatttgttta	caccacaata	tatctgcca	ccagccagcc	aacagctccc	gagccggcag	1740
25	ctcggcacia	aatcaccacg	cgttaccacc	acgccggccg	gccgcattgt	gttgaccgtg	1800
	ttcggcggca	ttgccgagtt	cgagcgttcc	ctaatcatcg	accgcaccgg	gagcgggctg	1860
	gaggccgcca	aggcccaggg	cgtgaagttt	ggccccggcc	ctaccctcac	cccggcacag	1920
	atcgccgacg	cccgcgagct	gatcggaccg	gaaggccgca	ccgtgaaaga	ggcggctgca	1980
	ctgcttggcg	tgcatcgctc	gacctgttac	cgcgcacttg	agcgcagcga	ggaagtgcag	2040
	cccaccgagg	ccaggcggcg	cggtgccttc	cgtaggagcg	cattgaccga	ggccgacgcc	2100
	ctggcgggcc	ccgagaatga	acgccaagag	gaacaagcat	gaaaccgcac	caggacggcc	2160
30	aggacgaacc	gtttttcatt	accgaagaga	tcgaggcggg	gatgatcgcg	gccgggtacg	2220
	tgttcgagcc	gcccgcgcac	gtctcaaccg	tgcggctgca	tgaaatcctg	gccggtttgt	2280
	ctgatgccaa	gctggcggcc	tggccggcca	ctttggccgc	tgaagaaacc	gagcggccgc	2340
	gtctaaaaag	gtgatgtgta	tttgagtaaa	acagcttgcg	tcatgcggtc	gctgctgata	2400
	tgatgcatg	agtaaataaa	caaatacgca	agggaaacgc	atgaaggtta	tcgctgtact	2460
	taaccagaaa	ggcgggtcag	gcaagacgac	catcgcaacc	catctagccc	gcgccctgca	2520
35	actcgccggg	gccgatgttc	tgttagtcga	ttccgatccc	cagggcagtg	cccgcgattg	2580
	ggcggccgtg	gggaaagatc	aaccgctaac	cttgtcggc	atcgaccgcc	cgacgattga	2640
	ccgcgacgtg	aaggccatcg	gccggcgcga	cttcgtagtg	atcgaccggg	cgccccaggc	2700
	ggcggacttg	gctgtgtccg	cgatcaaggc	agccgacttc	gtgctgattc	cggtgcagcc	2760
	aagcccttac	gacatatggg	ccaccgcccga	cctgggtggg	ctggttaagc	agcgcattga	2820
	ggtcacggat	ggaaggctac	aagcggcctt	tgtcgtgtcg	cgggcgatca	aaagcagcgg	2880
40	catcgccggt	gaggttgcgg	aggcgtggc	cggttacgag	ctgcccattc	ttgactcccg	2940
	tatcacgcag	cgctgagct	accagggcac	tgccgcccgc	ggcacaaccg	ttcttgaatc	3000
	agaaccggag	ggcgcgctg	cccgcgaggt	ccaggcgtcg	gccgctgaaa	ttaaatcaaa	3060
	actcatttga	gttaatgagg	taaagagaaa	atgagcaaaa	gcacaaacac	gctaagtgcc	3120
	ggccgtccga	gcccacgcag	cagcaaggct	gcaacgttgg	ccagcctggc	agacacgcca	3180
	gcatgaagc	gggtcaactt	tcagttgccc	gcggaggatc	acaccaagct	gaagatgtac	3240
45	gcggtagcgc	aaggcaagac	cattaccgag	ctgctatctg	aatacatcgc	gcagctacca	3300
	gagtaaata	gcaaatgaat	aatgagtag	atgaatttta	gcggctaaag	gaggcggcat	3360
	ggaaaatcaa	gaacaaccag	gcaccgacgc	ctgggaatgc	cccatgtgtg	gaggaacggg	3420
	cggttggcca	ggcgtaaagc	gctgggttgt	ctgcccggcc	tgcaatggca	ctggaacccc	3480
	caagcccag	gaatcggcgt	gagcggctcg	aaaccatccg	gcccgggtaca	aatcggcggc	3540
	gcgctgggtg	atgacctgg	ggagaagttg	aaggccgcgc	aggccgccc	gcggcaacgc	3600
	atcgaggcag	aagcacgccc	cggtgaatcg	tggcaagcgg	ccgctgatcg	aatccgcaaa	3660
50	gaatcccggc	aaccgcccgc	agccgggtgc	ccgtcgatta	ggaagccgca	caagggcgac	3720
	gagcaaccag	atttttcgt	tccgatgctc	tatgacgtgg	gcacccgcga	tagtcgcagc	3780
	atcatggacg	tggccgtttt	ccgtctgtcg	aagcgtgacc	gacgagctgg	cgaggtgatc	3840
	cgctacgagc	ttccagacgg	gcacgtagag	gtttccgacg	ggccggccgg	catggccagt	3900
	gtgtgggatt	acgacctggt	actgatggcg	gtttccatc	taaccgaatc	catgaaccga	3960
	tccgggaag	ggaagggaga	caagcccggc	cgctgttcc	gtccacacgt	tgcggacgta	4020
55	atcaagttct	cccggcgcag	cgatggcggg	aagcagaaag	acgacctgtg	agaaacctgc	4080
	attcggttaa	acaccacgca	cgttgccaat	cagcgtacga	agaaggccaa	gaacggccgc	4140
	ctggtagcgg	tatccgaggg	tgaagccttg	attagccgct	acaagatcgt	aaagagcgaa	4200

	accggg	cggagt	cgagat	ctagct	ggatgt	cgagat	4260
	gaaggc	acccgg	gctgac	cacccg	actttt	cgatcc	4320
	atcggc	ttctct	cctggc	cgccgc	gcaagc	agccag	4380
	ttgttc	cgatct	acgcag	agccgc	agttca	gttctg	4440
5	accgtg	agctga	gtcaat	ctgccg	acgatt	ggaggag	4500
	ggcagg	gcccga	agtcag	taccgc	tgatcg	cgaagca	4560
	gcccgt	aatgtac	gcagat	ggcaca	ccctag	ggaaaa	4620
	cgaaaag	tctttc	ggatag	tacatt	acccaa	gtacatt	4680
	aaccgga	cgacatt	gaaccca	ccgtac	ggaacc	acacat	4740
	gtgact	taaaaga	aaaagg	ttttcc	aaaact	aaaact	4800
10	aaaact	aaaccc	ggcctg	taactg	gccagc	agccga	4860
	ctgcaaa	cgctacc	tccgtc	cgctcc	gccccg	ttcgcg	4920
	ccatcgc	ccgtgg	ctcaaaa	gtggcc	ggccagg	tctacc	4980
	cgcgga	ccgcgc	gccact	cgccgc	cacatca	cacctgc	5040
	cgcggt	ggtgat	gtgaaa	ctgaca	cagctcc	agacggt	5100
	agcttg	taagcg	ccggag	acaagc	cagggc	cagcgg	5160
15	tggcgg	cgggcg	ccatga	gtcacg	gatagc	tgtact	5220
	cttaact	cgcatc	gcagatt	ctgagag	accata	gtgtgaa	5280
	ccgcaca	gcgtaag	aaaatac	atcagcg	cttccg	ctcgctc	5340
	gactcgc	gctcgg	tccgct	cgagcg	cagctca	aaaggcg	5400
	atacgg	ccacaga	aggggata	gcaggaa	acatgtg	aaaaggc	5460
	caaaagg	ggaacc	aaaggcc	ttgtgg	ttttcca	gctccgc	5520
	ccagcag	atcacaaa	tgacag	agtcag	ggcgaac	gacagca	5580
20	taaagata	aggcgt	ccctgga	tccctcg	gctctc	tccgacc	5640
	ccgcttac	gatacct	cgctttc	cttccgg	gcgtgg	ttctcat	5700
	tcacgct	ggtatct	ttcgggt	gtcgtc	ccaagct	ctgtgtg	5760
	gaaccccc	ttcagcc	ccgctgc	ttatccg	actatcg	tgagtcca	5820
	ccggta	acgact	gccactg	gcaccac	gtaacag	tagcagag	5880
25	aggatgat	cggtgt	agagttc	aagtgg	ctaacta	ctacact	5940
	aggacagt	ttggtat	cgctctg	aagccag	ccttcgg	aagagtt	6000
	agctctt	ccggcaa	aaccacc	ggtagcg	gtttttt	ttgcaag	6060
	cagattc	gcagaaaa	aggatct	gaagatc	tgatctt	tacgggt	6120
	gacgtcag	ggaacgaaa	ctcacgt	ggatttt	tcatgca	tatatct	6180
	aatttgt	gggcttat	tgacgct	aaaataa	aagcaga	gacctga	6240
	tttggct	agcaatt	tgcttag	atctaac	tgagtta	cgccgcg	6300
30	agcggcg	gcttga	atcttag	agacatt	tgccgac	cttgggt	6360
	tcctctt	cgtagt	aaattct	aactgat	cgccgag	caagcga	6420
	tcttctt	caagata	ctgtctag	tcaagta	cgggctg	ctgggcc	6480
	aggcgtc	ttgccag	ggcagcg	tcctcgg	cgatttt	ggttact	6540
	ctgtacca	tgccggaca	cgtaagc	acatttc	catcgcc	ccagtcg	6600
	ggcagatt	atagcgt	ggtttca	agcgcct	atagatc	ttcagga	6660
35	ggatcaa	gttctcc	ctgtgg	accaagg	cgctatg	tcttgct	6720
	gtacaca	tagccag	aatgtcg	gtggctg	cgaagata	tgcaaga	6780
	tcattg	gccattc	aaattgc	tcgcgct	ctggata	ccacgga	6840
	atgtcgc	gcacaaca	ggtgact	acagcgc	gaatctc	cttccag	6900
	gaagccg	tttccaaa	gtcgttg	aaagctc	gcgttgt	atcaagc	6960
	acggtcac	taaccag	atcaatat	ctgtgtg	tcaggcc	atccact	7020
40	gagccg	aatgtac	cagcaac	ggttcg	ggcgtcg	gacgcc	7080
	acctctg	gttgagt	tacttcg	atcaccg	ccccatg	gtttaac	7140
	gttttag	gactgcc	ctgcgta	tcgttgc	tccataa	caacatc	7200
	cccacgg	aacgcgt	ctgcttg	gcccagg	tagactg	ccccaaaa	7260
	cagtcata	aagccat	aaccggc	gcgggg	catggac	caaatgg	7320
	aacggata	cttttcac	ccctttt	tatccga	ttctaata	cgctctt	7380
45	tcttagg	acccgca	atctctg	aaactgt	agtttaa	gaaggcg	7440
	aacgaca	agatcta	ggaacag	atgacc	ttacgcc	cttgcag	7500
	tgcaag	ctctag	tcgatccc	ggtagtc	ttccttat	tacgtcc	7560
	agaaaccc	acccgtg	tcaaaaa	gcacggc	tgggcatt	gtctgg	7620
	cgaaaact	ggaattg	agcgttg	ggaaagc	ttacaag	gcccggc	7680
	tgctgtg	ggcagtt	acgatc	cgccgat	gatattc	attatgc	7740
	caacgtc	tatcagc	aagtctt	accgaa	tgggcag	agcgtat	7800
50	gctgcgt	gatgcgt	ctcatt	caaagt	gtcaata	aggaagt	7860
	ggagcat	ggcggct	gcctatt	agccgat	acgccgat	ttattgc	7920
	gaaaagt	cgtaagt	tgcttct	tttgata	atataata	tatcatta	7980
	tagtagt	ataatatt	aaatatt	ttcaaaa	aagaatg	tatatag	8040
	ttgcttt	gtagttt	agtgtgt	ttttaatt	taacttt	aatatat	8100
	caaaatt	tgatgtg	gtatcac	ttgtgtg	aacgaac	actggc	8160
55	tatccc	ggaatgg	ttaccg	aaacggc	aaaaagc	cttactt	8220
	tgattt	taactag	gaatcca	cagcgt	ctctaca	cgccgaa	8280
	ctgggt	gatatac	tggtgac	gtcgcg	gactgta	acgcgt	8340

	tgactggcag	gtggtggcca	atggtgatgt	cagcgttgaa	ctgcgtgatg	cggatcaaca	8400
	ggtggttgca	actggacaag	gcactagcgg	gactttgcaa	gtggtgaatc	cgcacctctg	8460
	gcaaccgggt	gaaggttatc	tctatgaact	gtgctgcaca	gccaaaagcc	agacagatgt	8520
	tgatatctac	ccgcttcgcg	tccgcatccg	gtcagtgcca	gtgaagggcg	aacagttcct	8580
5	gattaaccac	aaaccgttct	actttactgg	ctttggtcgt	catgaagatg	cggacttgcg	8640
	tggaagga	ttcgataacg	tgctgatggt	gcacgaccac	gcattaatgg	actggattgg	8700
	ggccaactcc	taccgtacct	cgcattaccc	ttacgctgaa	gagatgctcg	actgggcaga	8760
	tgaacatggc	atcgtgggtg	ttgatgaaac	tgctgctgtc	ggctttaacc	tctctttagg	8820
	cattggttcc	gaagcgggca	acaagccgaa	agaactgtac	agcgaagagg	cagtcaacgg	8880
	ggaaactcag	caagcgcact	tacaggcgat	taaagagctg	atagcgcgtg	acaaaaacca	8940
10	ccaagcgtg	gtgatgtgga	gtattgcaa	cgaaccggat	acccgtccgc	aaggtgcacg	9000
	ggaatatttc	gcgccactgg	cggaagcaac	gcgtaaactc	gacccgacgc	gtccgatcac	9060
	ctgctcaat	gtaatgttct	gcgacgctca	caccgatacc	atcagcgtac	tctttgatgt	9120
	gctgtgcctg	aaccgttatt	acggatggta	tgcccaaagc	ggcgatttgg	aaacggcaga	9180
	gaaggtactg	gaaaaagaac	ttctggcctg	gcaggagaaa	ctgcatcagc	cgattatcat	9240
	caccgaatac	ggcgtggata	cgtagccgg	gctgcactca	atgtacaccg	acatgtggag	9300
15	tgaagagtat	cagtgtgcat	ggctggatat	gtatcaccgc	gtctttgatc	gcgtcagcgc	9360
	cgctgcgggt	gaacaggtat	ggaatttcgc	cgattttgcg	acctcgcaag	gcataatgct	9420
	cgttggcggt	aacaagaag	ggatcttcac	tcgcgaccgc	aaaccggaag	cggcggtctt	9480
	tctgctgcaa	aaacgctgga	ctggcatgaa	cttcggtgaa	aaaccgcagc	agggaggcaa	9540
	acaatgagag	ctcgaatttc	cccgatcggg	caaacatttg	gcaataaagn	ttcttaagat	9600
	tgaatcctgt	tgccggctct	gcgatgatta	tcatataaatt	tctggtgaat	tacgtaagc	9660
	atgaaataat	taacatgtaa	tgcatgacgt	tatttatgag	atgggttttt	atgattagag	9720
20	tcccgaat	atacatttaa	tacgcatag	aaaacaaaat	atanccgca	aactaggata	9780
	aattatcgcg	cgcggtgtca	tctatgttac	tagatcggga	attcccatgc	ctcgaggatc	9840
	taacatgctt	agatacatga	agtaacatgc	tgctacgggt	taataattct	tgagttgatt	9900
	tttactggta	cttagataga	tgatataaca	tgcttagata	catgaagtaa	catgctccta	9960
	cagttccttt	aatcattatt	gagtacctat	atattctaatt	aaatcagtat	gttttaatt	10020
	atthtgattt	tactgggtact	tagatagatg	tatatataca	tgctcaaaaca	tgcttagata	10080
25	catgaagtaa	catgctgcta	cggtttagtc	attattgagt	gcctataaatt	tctaataaatt	10140
	cagtatgttt	taaattatth	tgatthtact	ggtagcttaga	tagatgtata	tatacatgct	10200
	caacatgct	tagatacatg	aagtaatatg	ctactacggg	ttaattgttc	ttgagtacct	10260
	atataattcta	ataaatcagt	atgthttaaa	ttatttcgat	tttactggta	cttagataga	10320
	tgtatatata	catgcttaga	tacatgaagt	aacatgctac	tacggthtaa	ttgthcttga	10380
	atacctatat	attctaataa	atcagtatgt	thtaaatat	thcgatthta	ctggtagctta	10440
30	gatagatgta	tatatacatg	ctcgaacatg	cttagatata	tgaagtaaca	tgctacatat	10500
	atattataat	aaatcagtat	gtctthaaatt	atthtgattt	tactggtagt	tagatagatg	10560
	tatatacatg	ctcaaacatg	cttagatata	tgaagtaaca	tgctactacg	gtthaatcat	10620
	tattgagtac	ctatatattc	taataaatca	gtatgthttc	aattgthttg	atthtactgg	10680
	tacttagata	tatgtatata	tacatgctcg	aacatgctta	gatcgtgaa	gtaacatgct	10740
	actatggtha	atthgtcttg	agtacctata	tattctaata	aatcagtatg	ththaaatta	10800
35	thtcgatttt	actggtagct	agatagatgt	atatacatat	gctcgaacat	gcttagatag	10860
	atgaagttaac	atgctactac	gththaatcg	thcttgagta	cctatatatt	ctaataaatc	10920
	agtatgtctt	aaattatctt	gattthtactg	gtacttagat	agatgtatat	acatgcttag	10980
	atacatgaag	taacatgcta	ctatgattta	atcgttcttg	agtacctata	tattctaata	11040
	aatcagtatg	thththaaatta	ththtgatttt	actggtagctt	agatagatgt	atatacatat	11100
	gctcgaacat	gcttagatata	atgaagtaac	atgctactac	gththaatca	thcttgagta	11160
40	cctatatatt	ctaataaatc	agtatgthtt	taattattht	gatattactg	gtactthaa	11220
	tgthtagata	catcatatag	catgcacatg	ctgctactgt	thaatcattc	gtgaataacct	11280
	atataattcta	atataatcag	atgthcttcta	attattatga	ththtgatgta	cttgtagtgg	11340
	ggcatatgct	gcagctatgt	gtagatthttg	aataaccag	gtgatgagca	tgcatggcgc	11400
	cttcatagtt	catatgtctgt	thatttctct	tgagactgth	ctththtgth	gatagctacc	11460
	ctgthtgthg	gtgattctta	tgaccccg	gatctcttag	agtcgacctg	caggcgccg	11520
45	cactagtgat	taggattcca	acgcgagcca	ggacaagcga	ggaaccttg	gtgcgaggcg	11580
	aggccgcccc	gctccgattc	gattcgacgc	gcaggcgag	gcgcagggat	ggacgccttc	11640
	tactcgacct	cgtcggcg	ggcgagcgg	ggggccacg	actccctca	gaacttccgc	11700
	cagatctccc	ccgcgtgca	gtcccacctc	aagctcgtht	acctgactct	atgctthgca	11760
	ctggcctcat	ctgccgtgg	tgcttaccta	cacattgccc	tgaacatcg	cgggatgctg	11820
	acaatgctcg	cttggtgctg	aactatgcc	tggatgthct	cggtgccagt	ctatgaggag	11880
	aggaagaggt	ttgggctgct	gatgggtgca	gccctcctgg	aagggtcttc	gthtgacct	11940
50	ctgatgtgac	ttgccataga	ctthgaccca	agcatcctcg	tgacagggth	tgctggaaacc	12000
	gccatcgctt	ttgggtgctt	ctctggcgcc	gccatcatcg	ccaagcgag	ggagtacctg	12060
	tacctcggtg	gcctgctctc	gtctggcctg	tcgatcctgc	tctggctgca	gthtgctacg	12120
	tccatctthg	gccactcttc	tggcagcttc	atgthtgagg	thtactthgg	cctgthgatc	12180
	thctgggggt	acatggtgta	cgacacgcag	gagatcatcg	agagggcgca	cctggcgac	12240
	atggactaca	tcaagcacgc	cctcaccttc	thcacctcag	ttgthgctt	cctcgtcca	12300
55	gtcctcatca	ctatgctcaa	gaacgcagg	gacaagctgg	aggacaagaa	gaagaggaag	12360
	aggggtctt	gaacgtwtct	cccgcacatg	tagatacctg	caccgcgtcg	acctgcaggc	12420
	atgcccgtg	aaatcaccag	tctctctcta	caaatctatc	tctctcataa	taatgtgta	12480

EP 2 081 954 B1

gtagttcca gataagggaa ttagggttct tataggggtt cgctcatgtg ttgagcatat 12540
aagaaaccct tagtatgtat ttgtatttgt aaaatacttc tatcaataaa atttctaatt 12600
cctaaaacca aaatccagtg ggtaccgagc tcg 12633

5

<210> 35

<211> 5598

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

10

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: recombinant expression vector pOXoBI-1

<400> 35

15

20

25

30

35

40

45

50

55

	ggggatcctc	tagagtcgac	ctgcaggcgg	ccgcactagt	gattaggatt	ccaacgcgag	60
	ccaggacaag	cgaggaacct	tgcgtgcgag	gcgaggccgc	cccgcgccga	ttcgattcga	120
	cgcgcaggcg	caggcgcagg	gatggacgcc	ttctactcga	cctcgtcggc	ggcggcgagc	180
5	ggctggggcc	acgactccct	caagaacttc	cgccagatct	ccccgcctgt	gcagtcccac	240
	ctcaagctcg	tttacctgac	tctatgcttt	gcactggcct	catctgcccgt	gggtgcttac	300
	ctacacattg	ccctgaacat	cggcgggatg	ctgacaatgc	tcgcttgtgt	cggaactatc	360
	gcctggatgt	tctcgggtgcc	agtctatgag	gagaggaaga	ggtttgggct	gctgatgggt	420
	gcagccctcc	tgaagggggc	tccggttggg	cctctgattg	agcttgccat	agactttgac	480
	ccaagcatcc	tctgtgacagg	gtttgtcggg	accgccatcg	cctttggggtg	cttctctggc	540
	gccgccatca	tcgccaagcg	cagggagtac	ctgtacctcg	gtggcctgct	ctcgtctggc	600
10	ctgtcgatcc	tgctctggct	gcagtttgtc	acgtccatct	ttggccactc	ctctggcagc	660
	ttcatgtttg	aggtttactt	tggcctgttg	atcttcctgg	ggtacatggt	gtacgacacg	720
	caggagatca	tcgagagggc	gcaccatggc	gacatggact	acatcaagca	cgccctcacc	780
	ctcttcaccg	actttgtttg	cgctcctcgt	cgagtcctca	tcatcatgct	caagaacgca	840
	ggcgacaagt	cggaggacaa	gaagaagagg	aagagggggg	cctgaacgtw	tctcccgcac	900
	atgtagatcc	cgtcaccgcg	tcgacctgca	ggcatgcccc	ctgaaatcac	cgatctctct	960
15	ctacaaatct	atctctctca	taataatgtg	tgagtgttcc	ccagataagg	gaattagggg	1020
	tcttataggg	tttcgctcat	gtggtgagca	tataagaaac	ccttagtatg	tatttgtatt	1080
	tgtaaaatcc	ttctatcaat	aaaatttcta	attcctaaaa	ccaaaatcca	gtgggtaccg	1140
	agctcgaatt	caagcttggc	actggccgtc	gtttacaac	gtcgtgactg	ggaaaacctt	1200
	ggcgttacc	aaacttaatcg	ccttgacgca	catccccctt	tcgccagctg	gcgtaaatagc	1260
	gaagaggccc	gcaccgatcg	cccttcccaa	cagttgcgca	gcctgaatgg	cgaatggcgc	1320
20	ctgatgcggg	atcttctcct	tacgcatctg	tcgggtatct	cacaccgcat	atggtgcaact	1380
	ctcagtaaaa	tctgctctga	tgccgcatag	ttaagccagc	cccgcacacc	gccaacaccc	1440
	gctgacgcgc	cctgacgggc	ttgtctgctc	ccggcatccg	cttacagaca	agctgtgacc	1500
	gtctccggga	gctgcatgtg	tcagagggtt	tcaccgtcat	caccgaaacg	cgcgagacga	1560
	aagggcctcg	tgatacgctt	atctttatag	gttaatgtca	tgataataat	ggtttcttag	1620
	acgtcaggtg	gcacttttct	gggaaatgtg	cgcggaaccc	ctatctgttt	atctttctaa	1680
	atacattcaa	atatgtatcc	gctcatgaga	caataaccct	gataaatgct	tcaataatat	1740
25	tgaaaaagga	agagtatgag	tattcaacat	ttcgtgtctg	cccttattcc	cttttttgcg	1800
	gcattttgcc	ttcctgtttt	tgctcaccca	gaaacgctgg	tgaaagtaaa	agatgctgaa	1860
	gatcagttgg	gtgcacgagt	gggttacatc	gaactggatc	tcaacagcgg	taagatcctt	1920
	gagagttttc	gccccgaaga	acgttttcca	atgatgagca	cttttaaagt	tctgctatgt	1980
	ggcggggtat	tatcccgtat	tgacgcccgg	caagagcaac	tcggtcgccg	catacactat	2040
30	tctcagaatg	acttggttga	gtactcacca	gtcacagaaa	agcatcttac	agatggcatg	2100
	acagtaagag	aattatgcag	tgctgccata	accatgagtg	ataaactgct	ggccaactta	2160
	cttctgacaa	cgatcggagg	accgaaggag	ctaaccgctt	ttttgcacaa	catgggggat	2220
	catgtaactc	gccttgatcg	ttgggaaccg	gagctgaatg	aagccatacc	aaacgacgag	2280
	cgtgacacca	cgatgcctgt	agcaatggca	acaacgttgc	gcaaactatt	aactggcgaa	2340
	ctacttactc	tagcttcccc	gcaacaatta	atagactgga	tggaggcggg	taaagttgca	2400
35	ggaccacttc	tgcgctcggc	ccttccggct	ggctggttta	ttgctgataa	atctggagcc	2460
	gggtgagcgtg	ggtctcgcgg	tatcattgca	gcactggggc	cagatggtaa	gccctcccgt	2520
	atcgtagtta	tctacacgac	ggggagtcag	gcaactatgg	atgaacgaaa	tagacagatc	2580
	gctgagatag	gtgcctcact	gattaagcat	tggttaactgt	cagaccaagt	ttactcatat	2640
	atacttttaga	ttgatttaaa	acttcatttt	taatttaaaa	ggatctaggt	gaagatcctt	2700
	tttgataatc	tcatgaccaa	aatcccttaa	cgtagatctt	cgttccactg	agcgtcagac	2760
	cccgtagaaa	agatcaaagg	atcttcttga	gatccttttt	ttctgcccgt	aatctgctgc	2820
40	ttgcaaacaa	aaaaaccacc	gctaccagcg	gtggtttggt	tgccggatca	agagctacca	2880
	actctttttc	cgaaggtaac	tggcttcagc	agagcgcaga	taccaaatat	tgttcttcta	2940
	gtgtagccgt	agttaggcca	ccacttcaag	aactctgtag	caccgcctac	atacctcgct	3000
	ctgctaattcc	tgttaccagt	ggctgctgcc	agtggcgata	agtcgtgtct	taccgggttg	3060
	gactcaagac	gatagttacc	ggataaggcg	cagcggtcgg	gctgaacggg	gggtctgctg	3120
	acacagccca	gcttggagcg	aacgacctac	accgaactga	gatacctaca	gcgtgagctt	3180
45	tgagaaagcg	ccacgcttcc	cgaagggaga	aaggcggaca	ggtatccggg	aagcggcagg	3240

50

55

EP 2 081 954 B1

5 gtcggaacag gagagcgcac gagggagcct ccagggggaa acgcctggta tctttatagt 3300
 cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg 3360
 cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg 3420
 ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc 3480
 gcttttgagt gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgag cgagtcaagt 3540
 agcgaggaag cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg ttggccgatt 3600
 cattaatgca gctggcacga caggtttccc gactggaaag cgggacagtga gcgcaacgca 3660
 attaatgtga gttagctcac tcattaggca ccccaggctt tacactttat gcttccggct 3720
 cgtatgtgtg gtggaattgt gagcggataa caatttcaca caggaaacag ctatgacct 3780
 gattacgaat tcccatgcct cgagcagaaa gatataatat gtaaaaaaat gggtctatat 3840
 10 atatggaagg ttccaggaag acaaaggttc tagaaaacttc caaaaaaaat ccagaatata 3900
 ttttggaaga aataccctct tgggttgccc ccggcgcagc ccctagtggg ccaaaaagcc 3960
 acgatctaata cccgggtctaa ttgggtctaata agtttagact tctaattaga cgggtctcta 4020
 tgccggctca attggctcaa ttagattaaa atcctaatta aatatgaacg caactaggct 4080
 tccccctctc ctagttttct cggagctctt tttcatggac cttgaagtat tgcccgactca 4140
 ctacttcgga actcgtggat acttcagagt gcacatctac tttgaatctt gattggtaga 4200
 15 tcatctcgga gaaattctca cagttgggag gtataaccag ttgccgaaat tgccatgctt 4260
 cactcacagc caggatcagc ccatgtccca aggcaaccct tgtagctaca tgccgaggcc 4320
 tgactacttg gggcctcgcg ccctgcattt ttgcatgttc atgtgacag ttaaatgttg 4380
 agagaaatag attactaaat atcacccatt tcgttattct agatgagtat cctacaatat 4440
 gtataccgaa aaatgtatct taaactgtgg tagtgagaa agatctatta aaaagaactc 4500
 tacgtatact cccccctccc aatccccatc caggtttgta agacactttc gtctttttt 4560
 gccgaatttt aaccgtaaat ttgactagta aaaataagtt atactgaatg taataaatat 4620
 20 cgtacattcg gatgttggag acagggagag gctggctggg gctgctggat gatcacggtc 4680
 agaaagtctg acttgcaacg ccacaggccc gttgattgcc actgacaacc aagttttcgt 4740
 tgtttcgctg gtgccatatt ttccgcgatc gaatatttaa actgcgagga gaaaggcaag 4800
 cagggcgcca tatcagcact tgatcactca ctgatcgatc agtagtagcc accttctctg 4860
 gcgccagctg ttatatatta ttggcaacaa gtcatcgatt gagaacagaa acaaaaacag 4920
 aagagaacta tttgagagag agtagttacg ccgcagcgag tagcctcca tttctgacga 4980
 25 tcatgccata cgataaacg gccggcggcg agaccagtta gcaaggttga aatgccaca 5040
 catgtcgcgc tcatttctcg gctttttcat tttgcatgtc gtcatgcagg ccctggacac 5100
 tgacatttct ctcttttgct gttgaaatgaa gaccctaacc tttcaccatc agcacgcccc 5160
 tcaacttgat aagcctagac gaaaccata tgcatgattg atgagtaatg gtgtgcacga 5220
 atattatgaa cccgtttcca agagcaatac tccattgaga tacacctcct cttgtatct 5280
 30 gttcgttggg cccatttcca tagcagccgg cagtggcctt gactctgact gccacgcaag 5340
 taatatactt ttaataaact cgctgccttg cttcgtgtgt ccatgtgcaa atgcatgcag 5400
 tgacgacatg cacatgcata gcttaattag ctccatgcat ccactgcttc cattaatccc 5460
 ctatataaag gactccatat gcctcaccat tcaactatcc accacagctt agcagcagca 5520
 acaaccagtg ccatagacac tctccatcaa caaactctag ctgatcaatc ctagcctaagc 5580
 ttattacata gcaagccc 5598

35 <210> 36
 <211> 12776
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

40 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz : recombinant expression vector pLo114OxoBI-1

<400> 36

45

50

55

EP 2 081 954 B1

	aattcactgg	ccgtcgtttt	acaacgactc	agagcttgac	aggaggcccg	atctagtaac	60
	atagatgaca	ccgcgcgcga	taatttatcc	tagtttgcg	gctatatttt	gttttctatc	120
	gcgtattaaa	tgtataattg	cgggactcta	atcataaaaa	cccattctcat	aaataacgtc	180
5	atgcattaca	tgtaattat	tacatgctta	acgtaattca	acagaaatta	tatgataatc	240
	atcgcaagac	cggcaacag	attcaatctt	aagaaacttt	attgccaaat	gtttgaacga	300
	tcggggatca	tccgggtctg	tggcgggaac	tccacgaaaa	tatccgaacg	cagcaagatc	360
	tagagcttgg	gtcccgtca	gaagaactcg	tcaagaaggc	gatagaaggc	gatgctgctg	420
	gaatcgggag	cggcgatacc	gtaaagcacg	aggaagcgg	cagcccattc	gccgccaagc	480
	tcttcagcaa	tatcacgggt	agccaacgct	atgtcctgat	agcgggccgc	cacaccagc	540
	cggccacagt	cgatgaatcc	agaaaagcgg	ccattttcca	ccatgatatt	cggcaagcag	600
10	gcatcgccat	gggtcacgac	gagatcctcg	ccgtcgggca	tgcgcgctt	gagcctggcg	660
	aacagttcgg	ctggcgcgag	cccctgatgc	tcttcgtcca	gatcatcctg	atcgacaaga	720
	ccggcttcca	tccgagtacg	tgctcgctcg	atgcgatgtt	tcgcttggtg	gtcgaatggg	780
	caggtagccg	gatcaagcgt	atgcagccgc	cgcattgcat	cagccatgat	ggatactttc	840
	tcggcaggag	caaggtgaga	tgacaggaga	tctgccccg	gcacttcgcc	caatagcagc	900
	cagtcccttc	ccgcttcagt	gacaacgctg	agcacagctg	cgcaaggaac	gcccgtcgtg	960
15	gccagccacg	atagccgcgc	tgctcgtcc	tgcagttcat	tcagggcacc	ggacaggtcg	1020

20

25

30

35

40

45

50

55

	gtcttgacaa	aaagaaccgg	gcgcccctgc	gctgacagcc	ggaacacggc	ggcatcagag	1080
	cagccgattg	tctgttgtgc	ccagtcatag	ccgaatagcc	tctccacca	agcggccgga	1140
	gaacctgcgt	gcaatccatc	ttgttcaatc	atgcgaaacg	atccagatcc	ggtgcagatt	1200
5	atcttgattg	agagtgaata	tgagactcta	attggatacc	gaggggaatt	tatggaacgt	1260
	cagtgaggca	tttttgacaa	gaaatatttg	ctagctgata	gtgaccttag	gcgacttttg	1320
	aacgcgcaat	aatggtttct	gacgtatgtg	cttagctcat	taaactccag	aaaccgcg	1380
	ctgagtggtc	ccttcaacgt	tgcggttctg	tcagttccaa	acgtaaaacg	gcttgtccc	1440
	cgctcatcggc	gggggtcata	acgtgactcc	cttaattctc	cgctcatgat	cagattgtcg	1500
	tttcccgctt	tcagtttaaa	ctatcagtgt	ttgacaggat	cctgcttggg	aataattgtc	1560
	attagattgt	ttttatgcat	agatgcactc	gaaatcagcc	aatttttagac	aagtatcaaa	1620
10	cggatgttaa	ttcagtatat	taaagacgtc	cgcaatgtgt	tattaagtgt	tctaagcgtc	1680
	aatgtgttta	caccacaata	tatcctgcc	ccagccagcc	aacagctccc	cgaccggcag	1740
	ctcggcacia	aatcaccacg	cgttaccacc	acgccggcgg	gccgcatggt	gttgaccgtg	1800
	ttcggccgca	ttgccgagtt	cgagcgttcc	ctaatactcg	accgcacccg	gagcggcg	1860
	gaggccgcca	aggcccaggg	cgtgaagttt	ggccccgcc	ctaccctcac	cccggcacag	1920
	atcgcgcacg	cccgcgagct	gatcgaccag	gaaggccgca	ccgtgaaaga	gcccgtgca	1980
15	ctgcttggcg	tgcatcgctc	gacctgttac	cgcgacttg	agcgcagcga	ggaagtgcag	2040
	cccaccgagg	ccagcggcg	cggtgccttc	cgtaggacg	cattgaccga	ggccgacgcc	2100
	ctggcggccg	ccgagaatga	acgccaagag	gaacaagcat	gaaaccgcac	caggacggcc	2160
	aggacgaacc	gtttttcatt	accgaagaga	tcgaggcgg	gatgatcgcg	gcccgggtacg	2220
	gtttcagacc	gcccgcgcac	gtctcaaccg	tgccgctgca	tgaaatcctg	gcccgtttgt	2280
	ctgatgccaa	gctggcggcc	tggccggcca	gcttgccgc	tgaagaaacc	gagcggcc	2340
20	gtctaaaaag	gtgatgtgta	tttgagtaaa	acagcttgcg	tcattgcggtc	gctgcgtata	2400
	tgatgcgatg	agtaataaaa	caaatacgc	agggaaacgc	atgaaggtta	tcgctgtact	2460
	taaccagaaa	ggcgggtcag	gcaagacgac	catcgcaacc	catctagccc	gccccctgca	2520
	actcgcgggg	gcccgatgttc	tgttagtcca	ttccgatccc	cagggcagtg	cccgcgattg	2580
	ggcggccggtg	cggaagatc	aaccgctaac	cgttgtcggc	atcgaccgcc	cgaccattga	2640
	ccgcgacgtg	aaggccatcg	gcccggcgcga	cttcgtagt	atcgaccggg	cgcccaggc	2700
25	ggcggacttg	gctgtgtccg	cgatcaaggc	agccgacttc	gtgctgattc	cggtgcagcc	2760
	aagcccttac	gacatatggg	ccaccgccga	ctgtgtggag	ctggttaagc	agcgcattga	2820
	ggtcaccggat	ggaaggctac	aagcggcctt	tcgtgttcg	cgggcatca	aaggcacgcg	2880
	catcggcgggt	gaggttgccg	aggcgtggc	cggttacgag	ctgcccattc	ttgagttccg	2940
	tatcacgcag	cgctgagct	acccaggcac	tgccgcggcc	ggcacaaccg	ttcttgaatc	3000
	agaaccggag	ggcgacgctg	cccgcgaggt	ccaggcgtg	gcccgtgaaa	ttaaatcaaa	3060
30	actcaattga	gttaatgagg	taaagagaa	atagcaaaa	gcacaaacac	gcaagtgc	3120
	ggccgtccga	gcgcacgcag	cagcaaggct	gcaacgcttg	ccagcctggc	agacacgcca	3180
	gccatgaagc	gggtcaactt	tcagttgccc	gcccggagtc	acaccaagct	gaagatgtac	3240
	gcccgtacgcc	aaggcaagac	cattaccgag	ctgctatctg	aatacatcgc	gcagctacca	3300
	gagtaaatga	gcaaatgaat	aaatgagtag	atgaatttta	gcccgttaaag	gagggcgcat	3360
	ggaaaatcaa	gaacaaccag	gcaccgacgc	ctgtggaatg	cccattgtgtg	gaggaaccgg	3420
35	cggttgccca	ggcgtaagcg	gctgggttgt	ctgcccggcc	tgcaatggca	ctggaacccc	3480
	caagcccggag	gaatcggcgt	gagcggctgc	aaaccatccg	gcccgggtaca	aatcggcgcg	3540
	gcccgtgggtg	atgacctggt	ggagaagttg	aaggccgcgc	aggcccgcc	gcccgaacgc	3600
	atcgaggcag	aagcacgccc	cggtgaatcg	tcgcaagcgg	ccgctgatcg	aatcccga	3660
	gaatcccggc	aaccgcccgc	agccggctgc	ggctcgatta	ggaagccg	caagggcgac	3720
	gagcaaccag	atttttctgt	tccgatgctc	tatgacgtgg	gcacccgca	tagtgcgagc	3780
40	atcatggacg	tggccgtttt	ccgtctgtcg	aagcgtgacc	gacgagctgg	cgaggtgatc	3840
	cgctacgagc	ttccagacgg	gcacgtagag	gtttccgcag	ggccggccgg	catggccagt	3900
	gtgtgggatt	acgacctggt	actgatggcg	gtttccatc	taaccgaatc	catgaaccga	3960
	taccgggaag	ggaagggaga	caagcccggc	cgctgttcc	gtccacacgt	tgccgacgta	4020
	ctcaagttct	gcccgcgagc	cgatggcgg	aagcagaaag	acgacctggt	agaaacctgc	4080
	attcggttaa	acaccacgca	cgttgccatg	cagcgtacga	agaaggccaa	gaacggccgc	4140
	ctggtgacgg	tatccgaggg	tgaagccttg	attagccgct	acaagatcgt	aaagagcgaa	4200
45	accgggccc	cggagtacat	cgagatcgag	ctagctgatt	ggatgtaccg	cgagatcaca	4260
	gaaggcaaga	accggacggt	gctgacggtt	caccggatt	actttttgt	cgatcccggc	4320
	atcggccggt	ttctctaccg	cctggcacgc	cgccggcag	gcaaggcaga	agccagatgg	4380
	ttgttcaaga	cgatctacga	acgcagtggc	agcgcggag	agttcaagaa	gttctgtttc	4440
	accgtgccc	agctgatcgg	gtcaaatgac	ctgcccggag	acgatttgaa	ggaggaggcg	4500
	ggcgaggctg	gcccgatcct	agtcatgcgc	taccgcaacc	tgatcgaggg	cgaagcatcc	4560
50	gcccgttcc	aatgtaccgga	cgatgctga	gggcaaatg	ccctagcagg	ggaaaaggt	4620
	cgaaaaggtc	tctttctgt	ggatagcacg	tacattggga	acccaaagcc	gtacattggg	4680
	aaccggaacc	cgtacattgg	gaacccaag	ccgtacattg	ggaaccggtc	acacatgtaa	4740
	gtgactgata	taaaagagaa	aaaaggcag	ttttccgct	aaaactcttt	aaaacttatt	4800
	aaaacttcta	aaaccgcct	ggcctgtgca	taactgtctg	gccagcgcac	aaaccagag	4860
	ctgcaaaaag	cgccctacc	tcggctcgtg	cgctccctac	gccccgcgc	ttcgcgtcgg	4920
55	cctatcgcgg	ccgctggccg	ctcaaaaatg	gctggcctac	ggccaggcaa	tctaccaggg	4980
	cgccgacaag	ccgcgcccgc	gccactcgac	cgccggcggc	cacatcaagg	caccctgcct	5040
	cgccggtttc	ggtgatgacg	gtgaaaacct	ctgacacatg	cagctcccgg	agaccggtc	5100
	agcttgtctg	taagcggatg	ccgggagcag	acaagcccgt	cagggcgcgt	cagcgggtgt	5160

	tggcgggtgt	cggggcgcag	ccatgaccca	gtcacgtagc	gatagcggag	tgtatactgg	5220
	cttaactatg	cggcatcaga	gcagattgta	ctgagagtgc	accatatgcg	gtgtgaaata	5280
	ccgcacagat	gcgtaaggag	aaaataccgc	atcaggcgct	cttccgcttc	ctcgcctact	5340
	gactcgtgc	gctcggtcgt	tcggctgcgg	cgagcgggat	cagctcactc	aaaggcggta	5400
5	atacggttat	ccacagaatc	aggggataac	gcaggaaaga	acatgtgagc	aaaaggccag	5460
	caaaaggcca	ggaaccgtaa	aaaggccgcg	ttgctggcgt	ttttccatag	gctccgcccc	5520
	cctgacgagc	atcacaaaaa	tcgacgctca	agtacagaggt	ggcgaaacc	gacaggacta	5580
	taaagatacc	aggcgtttcc	ccctggaagc	tcctcgtg	gctctcctgt	tccgaccctg	5640
	ccgcttaccg	gatacctgtc	cgcttttctc	ccctcgggaa	gcgtggcgct	ttctcatagc	5700
	tcacgctgta	ggtatctcag	ttcgggtgtag	gtcgttcgct	ccaagctggg	ctgtgtgcac	5760
10	gaaccccccg	ttcagcccga	ccgctgcgcc	ttatccggta	actatcgtct	tgagtccaac	5820
	ccggtaagac	acgacttatc	gccactggca	gcagccactg	gtaacaggat	tagcagagcg	5880
	aggtatgtag	gcggtgctac	agagttcttg	aagtgggtgc	ctaactacgg	ctacactaga	5940
	aggacagtat	ttggatctg	cgctctgctg	aagccagtta	ccttcggaaa	aagagttggt	6000
	agctcttgat	ccggcaaaaca	aaccaccgct	ggtagcggtg	gtttttttgt	ttgcaagcag	6060
	cagattacgc	gcagaaaaaa	aggatctcaa	gaagatcctt	tgatcttttc	tacggggtct	6120
15	gacgctcagt	ggaacgaaaa	ctcacgttaa	gggattttgg	tcatgcatga	tatatctccc	6180
	aatttgtgta	gggcttatta	tgcacgctta	aaaataataa	aagcagactt	gacctgatag	6240
	tttggctgtg	agcaattatg	tgcttagtgc	atctaaccgct	tgagttaagc	cgcgccgga	6300
	agcggcgtcg	gcttgaacga	atctttagct	agacattatt	tgccgactac	cttggtgatc	6360
	tcgcctttca	cgtagtggac	aaattcttcc	aactgatctg	cgcgcgaggc	caagcgatct	6420
	tcttctttgc	caagataagc	ctgtctagct	tcaagatga	cgggctgata	ctgggcccgc	6480
20	agggcgtctc	ttgccagtc	ggcagcgaca	tccttcggcg	cgatthtgcg	ggttactgcg	6540
	ctgtaccaaa	tcggggacaa	cgtaagcact	acatttcgct	catcgccagc	ccagtcgggc	6600
	ggcgagttcc	atagcgtaa	ggtttcattt	agcgcctcaa	atagatcctg	ttcaggaacc	6660
	ggatcaaaga	gttctccgc	cgctggacct	accaaggcaa	cgctatgttc	tcttgctttt	6720
	gtcagcaaga	tagccagatc	aatgtcgatc	gtggctggct	cgaagatacc	tgcaagaatg	6780
	tcattgctgt	gccattctcc	aaattgcagt	tcgcgcttag	ctggataaac	ccacggaatg	6840
	atgtcgtcgt	gcacaacaat	ggtgacttct	acagcgcgga	gaatctcgtc	ctctccaggg	6900
25	gaagccgaag	tttccaaaag	gtcgttgatc	aaagctcgcc	gcgttgtttc	atcaagcctt	6960
	acggtcaccg	taaccagcaa	atcaatatca	ctgtgtggct	tcaggccgcc	atccactgcg	7020
	gagccgtaca	aatgtacggc	cagcaacgct	ggttcgagat	ggcgctcgat	gacgccaact	7080
	acctctgata	gttgagtcca	atcttcggcg	atcaccgctt	ccccatgat	gtttaacttt	7140
	gttttagggc	gactgccctg	ctgctgtaaca	tcgttgctgc	tccataacat	caaacatcga	7200
	cccacggcgt	aacgcgcttg	ctgcttgatg	gcccaggcca	tagactgtac	ccccaaaaaa	7260
30	cagtcataac	aagccatgaa	aaccgccact	gcgggggttc	catggacata	caaatggacg	7320
	aacggataaa	ccctttcacg	cccttttaaa	taaccgatta	ttctaataaa	cgctcttttc	7380
	tcttaggttt	accgccaat	atactctgtc	aaacaactgat	agttttaaact	gaaggcggga	7440
	aacgacaatc	agatctagta	ggaaacagct	atgaccatga	ttacgccaa	cttgcattgc	7500
	tcgaggtcca	ctctagagga	tcgatccccg	ggtaggtcag	tcccttatgt	tacgtcctgt	7560
	agaaacccca	accctgtaaa	tcaaaaaact	cgacggcctg	tgggcattca	gtctggatcg	7620
35	cgaaaactgt	ggaattggtc	agcgttggtg	ggaaaagcgc	ttacaagaaa	gcccggcaat	7680
	tgctgtgcca	ggcagtttta	acgatcagtt	cgccgatgca	gatattcgta	attatgcggg	7740
	caacgtctgg	tatcagcgcg	aagtctttat	accgaaaggt	tgggcaggcc	agcgtatcgt	7800
	gctgcgtttc	gatgcggtca	ctcattacgg	caaagtgtgg	gtcaataatc	aggaagtgat	7860
	ggagcatcag	ggcggtata	cgccatttga	agccgatgtc	acgccgatg	ttattgccgg	7920
	gaaaagtgta	cgtaagtttc	gctttctacc	ttgtataat	atataataat	tatcattaat	7980
40	tagatgtaat	ataatatttc	aaatattttt	ttcaaaataa	aagaatgtag	tatatagcaa	8040
	ttgcttttct	gtagtttata	agtgtgtata	ttttaattta	taacttttct	aatatatgac	8100
	caaaatthgt	tgatgtgcag	gtatcacctg	ttgtgtgaac	aacgaactga	actggcagac	8160
	tatcccgcgg	ggaatgggtga	ttaccgacga	aaacggcaag	aaaaagcagt	cttacttcca	8220
	tgatthcttt	aactatgccg	gaatccatcg	cagcgtaatg	ctctacacca	cgccgaacac	8280
	ctgggtggac	gatatcaccg	tggtgacgca	tgctgcgcaa	gactgtaacc	acgcgtctgt	8340
45	tgactggcag	gtggtggcca	atggtgatgt	cagcgttga	ctgcgtgatg	cggatcaaca	8400
	ggtggttgca	actggacaag	gcactagcgg	gactttgcaa	gtggtgaatc	cgacactctg	8460
	gcaaccgggt	gaagttatc	tctatgaa	gtgcgtcaca	gccaaaagcc	agacagagtg	8520
	tgatatctac	cgcttcgcg	tcggcatccg	ctcagtggca	gtgaagggcg	aacagttcct	8580
	gattaaccac	aaaccgttct	actttactgg	ctttggtcgt	catgaagatg	cggacttgcg	8640
	tggaagga	ttcgataacg	tgctgatggt	gcacgaccac	gcattaatgg	actggattgg	8700
	ggccaactcc	taccgtacct	cgcatthacc	ttacgctgaa	gagatgctcg	actgggcaga	8760
50	tgaaactggc	atcgtggtga	ttgatgaa	tgctgctgtc	ggctttaacc	tctcttttag	8820
	cattgttttc	gaagcgggca	acaagccgaa	agaactgtac	agcgaagagg	agtcacaagg	8880
	ggaaactcag	caagcgact	tacagggcat	taaagagctg	atagcgcgtg	acaaaaacca	8940
	ccaagcgtg	gtgatgtgga	gtattgccaa	cgaaccggat	acccgtccgc	aaggtgcacg	9000
	ggaatatttc	gcgccactgg	cggaaagca	gcgtaaac	gacccgacgc	gtccgatcac	9060
	ctcgttcaat	gtaatgttct	gcgacgtca	caccgatacc	atcagcgtac	tctttgatgt	9120
55	gctgtcctg	aaccgttatt	acggatggta	tgtccaaagc	ggcgatttgg	aaacggcaga	9180
	gaaggtactg	gaaaaagaac	ttctggcctg	gcaggagaaa	ctgcatcagc	cgattatcat	9240
	caccgaatac	ggcgtggata	cgtagccgg	gctgactca	atgtacaccg	acatgtggag	9300

	tgaagagtat	cagtgtgcat	ggctggatat	gtatcaccgc	gtctttgatc	gcgtcagcgc	9360
	cgtcgctcgg	gaacaggtat	ggaatttcgc	cgattttgcg	acctcgcaag	gcatattgcg	9420
	cgttggcggg	aacaagaag	ggatcttcac	tgcgcaccgc	aaaccggaag	cggcggtttt	9480
5	tctgctgcaa	aaacgctgga	ctggcatgaa	cttcggtgaa	aaaccgcagc	agggaggcaa	9540
	acaatgagag	ctcgaatttc	cccgatcggg	caaacatttg	gcaataaagn	ttcttaagat	9600
	tgaatcctgt	tgccggtcct	gcgatgatta	tcatataatt	tctggtgaat	tacgttaagc	9660
	atgtaataat	taacatgtaa	tgcatgacgt	tatttatgag	atgggttttt	atgattagag	9720
	tcccgcgaat	atacatthaa	tacgcgatag	aaaacaaaat	atanccgcga	aactaggata	9780
	aattatcgcg	cgcggtgtca	tctatgttac	atagatcgga	attcccatgc	ctcgagcaga	9840
10	aagatataat	atgtaaaaaa	atgggtctat	atatatggaa	ggtttcagga	agacaaaggt	9900
	tctagaaaact	tccaaaaaaa	atccagaata	tattttggaa	gaaataccct	cttgggttgg	9960
	ccccggcgca	gcccctagt	ggcaaaaaag	ccacgatcta	atcccggctc	aattggtcta	10020
	atagtttaga	cttctaatta	gacgggctct	tatgcccgtc	taattggctc	aattagatta	10080
	aaatccta	taaatatgaa	cgcaactagg	cttccccctc	ctctagtttt	ctcggagctc	10140
	ttttcatg	accttgaagt	attgccggat	cactacttcg	gaactcgtgg	atacttcaga	10200
15	gtgcacatct	actttgaatc	ttgattggta	gatcatctcg	gagaaattct	cacagttggg	10260
	aggataaacc	agttgccgaa	attgccatgc	ttcactcaca	gccaggatca	gcccattgtc	10320
	caaggcaacc	ctttagtag	catgccgagg	cctgactact	tggggcctcg	cgccctgcat	10380
	ttttgcatgt	tcatgtgaca	cgtaaagtgt	tgagagaaat	agattactaa	atatcaccga	10440
	tttcggttatt	ctagatgagt	atcctacaat	atgtataacc	aaaaatgtat	tttaaactgt	10500
	ggtaggtgag	aaagatctat	taaaaagaac	tctacgtata	ctccccctc	ccaatcccca	10560
	tccaggtttg	taagacactt	tcgtcttttt	ttgccgaatt	ttaaccgtaa	atgtgactag	10620
20	taaaaaataag	ttatactgaa	tgtataaat	atcgtaacat	cggatggtgg	agacaggagg	10680
	aggctggctg	gtgctgtgga	tggatcacgg	tcagaaagtc	tgacttgcaa	cgccacaggg	10740
	ccgttgattg	ccactgacaa	ccaagttttc	gttgtttcgc	tggtgcata	ttttccgcca	10800
	tcgaatattt	aaactgagag	gagaaaggca	agcagggcgc	catatcagca	cttgatcact	10860
	caactgatcga	tcagtagtag	ccacttctc	tgccgagcag	tgttatata	tattggcaac	10920
	aagtcatcga	ttgagaacag	aaacaaaaca	agaagagaac	tatttgagag	agagtagtta	10980
25	cgccgcagcg	agtgcctcc	catttctgac	gacatgcca	tacgataaac	cgccggcg	11040
	cgagaccagt	tagcaagggt	gaaatgcca	catatgctgc	gctcatttct	cggctttttc	11100
	atthtgcag	tcgtcatgca	ggccctggac	actgacattt	ctctcttttg	ctggtgaatg	11160
	aagaccctaa	cctttcacca	tcagcacgcc	cctcaacttg	ataagcctag	acgaaaccca	11220
	tatgcatgat	tgatgagtaa	tggtgtgcac	gaatattatg	aaccggtttc	caagagcaat	11280
	actccattga	gatacacctc	ctcctgtgat	ctgttcggtg	gtccatttc	catagcagcc	11340
30	ggcagttggc	ttgactctga	ctgccacgca	agtaatatat	ctttaataaa	ctcgtgcct	11400
	tgcttcgtgt	gtccatttgc	aaatgcatgc	agtgacgaca	tgacatgca	tagcttaatt	11460
	agctccatgc	atccactgct	tccatataat	ccctatataa	aggactccat	atgcctcacc	11520
	attcactcat	ccaccacagc	ttagcagcag	caacaaccag	tgccatagac	actctccatc	11580
	aacaaactct	agctgatcaa	tcctagctaa	gcttattaca	tagcaagccc	gggtgcttac	11640
	tagagtcgac	ctgacaggcg	ccgcactagt	gattaggatt	ccaacgcgag	ccaggacaag	11700
35	cgaggaacct	tgctgtgag	gcgagggcgc	cccgtccgga	ttcgatcga	cgcgagggcg	11760
	caggcgaggg	gatggacgcc	ttctactcga	cctcgtcggc	ggcggcgagc	ggctggggcc	11820
	acgactccct	caagaacttc	cgccagatct	ccccgcctgt	gcagtcccac	ctcaagctcg	11880
	tttactgtac	tctatgcttt	gcactggcct	catctgccgt	gggtgcttac	ctacacattg	11940
	ccctgaacat	cgccgggatg	ctgacaatgc	tcgcttgtgt	cggaactatc	gcctggatgt	12000
	tctcgggtcc	agtcctatgag	gagaggaaga	ggtttgggct	gctgatgggt	gcagccctcc	12060
	tggaaagggc	ttcggttgga	cctctgattg	agcttgccat	agacttgac	ccaagcatcc	12120
40	tcgtgacag	gtttgtcggg	accgccatcg	cctttggggtg	cttctctggc	gcccacatca	12180
	tcgccaagcg	caggaggtac	ctgtaccctg	gtggcctgct	ctcgtctggc	ctgtcagatcc	12240
	tgctctggct	gcagtttgtc	acgtccatct	ttggccactc	ctctggcagc	ttcatgtttg	12300
	aggtttactt	tgccctgttg	atcttctctg	ggtacatggt	gtacgacacg	caggagatca	12360
	tcgagagggc	gcaccatggc	gacatggact	acatcaagca	cgccctcacc	ctcttcaccg	12420
	actttgttg	cgctctcgtc	cgagtcctca	ctcatatgct	caagaacgca	ggcgacaagt	12480
45	cggaggacaa	gaagaagagg	aagagggggg	cctgaacgtw	tctcccgcac	atgtagatag	12540
	cgtcaccgcg	tcgacctgca	ggcatgcccg	ctgaaatcac	cagtctctct	ctacaaatct	12600
	atctctctca	taataatgtg	tgagtgttct	ccagataagg	gaattagggg	tcttataggg	12660
	tttcgctcat	gtgttgagca	tataagaaac	ccttagtatg	tatttgtatt	tgtaaaatac	12720
	ttctatcaat	aaaatttcta	attcctaaaa	ccaaaatcca	gtgggtaccg	agctcg	12776

50 <210> 37
 <211> 744
 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum

55 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(741)
 <223> coding for TaBI-1

EP 2 081 954 B1

<400> 37

5 atg gac gcc ttc tac tcg acc tcg tcg gcg gcg agc ggc tgg ggc 48
 Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ser Gly Trp Gly
 1 5 10

10 tac gac tcc ctc aag aac ttc cgc gag atc tcc ccc gcc gtg cag tcc 96
 Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Glu Ile Ser Pro Ala Val Gln Ser
 20

15 cac ctc aag ctc gtt tac ctg acc cta tgc ttt gcc ctg gcc tca tct 144
 His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Phe Ala Leu Ala Ser Ser
 35

20 gcc gtg ggt gct tac ctg cac att gcc ctg aac atc ggt ggg atg ctg 192
 Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu
 50

25 aca atg ctc gcg tgt gtt gga acc atc gcc tgg atg ttc tct gtg cca 240
 Thr Met Leu Ala Cys Val Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro
 65 70 75 80

30 gtc tat gag gag agg aag agg ttt ggg ctg ctg atg ggt gca gcc ctc 288
 Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu
 85 90 95

35 ctg gaa ggg gct tcg gtt gga cct ctg att gag ctt gcc ata gac ttt 336
 Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe
 100 105 110

40 gac cca agt atc ctc gtg aca ggg ttt gtc gga acc gcc atc gcc ttc 384
 Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe
 115 120 125

45 ggg tgc ttc tct ggc gcc gcc atc atc gcc aag cgc agg gag tac ctg 432
 Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu
 130 135 140

50 tac ctc ggt ggt ctg ctc tcc tcc ggc ctg tcg atc ctg ctc tgg ctg 480
 Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu
 145 150 155 160

55 cag ttt gcc acg tcc atc ttt ggc cac tcc tct ggc agc ttc atg ttt 528
 Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe
 165 170 175

60 gag gtt tac ttt ggc ctg ttg atc ttc ctg gga tac atg gtg tac gac 576
 Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp
 180 185 190

65 acg cag gag atc atc gag agg gcg cac cac ggc gac atg gat tac atc 624
 Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile
 195 200 205

70 aag cac gcg ctc acc ctc ttc acc gac ttc gtc gcc gtt ctc gtc cgc 672
 Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg
 210 215 220

75 gtc ctc atc atc atg ctc aag aac gca ggc gac aag tcg gag gac aag 720
 Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys
 225 230 235 240

80 aag aag agg aag agg ggg tcc tga 744
 Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser

<210> 38
 <211> 247
 <212> PRT

EP 2 081 954 B1

<213> Triticum aestivum

<400> 38

5 Met Asp Ala Phe Tyr Ser Thr Ser Ser Ala Ala Ala Ser Gly Trp Gly
1 10 5
Tyr Asp Ser Leu Lys Asn Phe Arg Glu Ile Ser Pro Ala Val Gln Ser
20 25 30
10 His Leu Lys Leu Val Tyr Leu Thr Leu Cys Phe Ala Leu Ala Ser Ser
35 40 45
Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Ile Ala Leu Asn Ile Gly Gly Met Leu
50 55 60
15 Thr Met Leu Ala Cys Val Gly Thr Ile Ala Trp Met Phe Ser Val Pro
65 70 75 80
Val Tyr Glu Glu Arg Lys Arg Phe Gly Leu Leu Met Gly Ala Ala Leu
85 90 95
20 Leu Glu Gly Ala Ser Val Gly Pro Leu Ile Glu Leu Ala Ile Asp Phe
100 105 110
Asp Pro Ser Ile Leu Val Thr Gly Phe Val Gly Thr Ala Ile Ala Phe
115 120 125
25 Gly Cys Phe Ser Gly Ala Ala Ile Ile Ala Lys Arg Arg Glu Tyr Leu
130 135 140
Tyr Leu Gly Gly Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu
145 150 155 160
30 Gln Phe Ala Thr Ser Ile Phe Gly His Ser Ser Gly Ser Phe Met Phe
165 170 175
Glu Val Tyr Phe Gly Leu Leu Ile Phe Leu Gly Tyr Met Val Tyr Asp
180 185 190
35 Thr Gln Glu Ile Ile Glu Arg Ala His His Gly Asp Met Asp Tyr Ile
195 200 205
Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Phe Val Ala Val Leu Val Arg
210 215 220
40 Val Leu Ile Ile Met Leu Lys Asn Ala Gly Asp Lys Ser Glu Asp Lys
225 230 235 240
Lys Lys Arg Lys Arg Gly Ser
245

45 <210> 39
<211> 1293
<212> DNA
<213> Hordeum vulgare

50 <220>
<221> CDS
<222> (173)..(1126)
<223> coding for Hordeum vulgare subsp. vulgare syntaxin (Ror2)

55 <400> 39

EP 2 081 954 B1

gtaactaacc ctttcttctt cccttgcca ctccgcttct ccccatccaa gaaacagcgc 60
caacagctcc acccatcgag gagaatcaag aaaccgcgcc ggcgtggtga tcaaggacat 120

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

EP 2 081 954 B1

ccatcgcgatcg atcgaccgac cctgccttgc ctgagtcac ccggcggcag cc atg aac 178
Met Asn
1

5 aac ctc ttc tcg agc tcg tgg aag cgg gcg ggc gcg ggg ggc gac ggg 226
Asn Leu Phe Ser Ser Ser Trp Lys Arg Ala Gly Ala Gly Gly Asp Gly
5 10 15

gac ctg gag tcg ggc ggc ggc ggc gtg gag atg acg gcg ccg ccg ggc 274
Asp Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Glu Met Thr Ala Pro Pro Gly
20

gcc gcg gcg ggg gcg agc ctg gac cgc ttc ttc gag gac gtg gag tcg 322
Ala Ala Ala Gly Ala Ser Leu Asp Arg Phe Phe Glu Asp Val Glu Ser
35 40 45

15 atc aag gac gac ctg cgg gag ctg gag cgg atc cag cgc tcc ctc cac 370
Ile Lys Asp Asp Leu Arg Glu Leu Glu Arg Ile Gln Arg Ser Leu His
55 60 65

gac ggc aac gag tcg ggc aag tcg ctc cac gac gcg tcg gcg gtg cgc 418
Asp Gly Asn Glu Ser Gly Lys Ser Leu His Asp Ala Ser Ala Val Arg
70 75 80

20 gcg ctc cgc tcc cgc atg gac gcc gac gtg gcc gcc gcc atc aag aag 466
Ala Leu Arg Ser Arg Met Asp Ala Asp Val Ala Ala Ala Ile Lys Lys
85 90 95

25 gcc aag gtg gtg aag ttg cgg ctc gag tcg ctc gac cgc gcc aac gcc 514
Ala Lys Val Val Lys Leu Arg Leu Glu Ser Leu Asp Arg Ala Asn Ala
100 105 110

gcc aac cgg tcc gtg gcc ggg tgc ggg ccg ggg tcg tcc acg gac cgc 562
Ala Asn Arg Ser Val Ala Gly Cys Gly Pro Gly Ser Ser Thr Asp Arg
115 120 125 130

30 acc cgc acc tcc gtc gtg gcc ggg ctg cgc aag aag ctg cgg gat gcc 610
Thr Arg Thr Ser Val Val Ala Gly Leu Arg Lys Lys Leu Arg Asp Ala
135 140 145

35 atg gag tcc ttc tcc tcc ctc cgc tcc cgc atc acc tcc gag tac cgg 658
Met Glu Ser Phe Ser Ser Leu Arg Ser Arg Ile Thr Ser Glu Tyr Arg
150 155 160

gaa acc gtg gcc cgc cgc tac ttc acg gtg acg ggg tcc cag ccc gac 706
Glu Thr Val Ala Arg Arg Tyr Phe Thr Val Thr Gly Ser Gln Pro Asp
165 170 175

40 gag gcc acg ctg gac acg ctg gcg gag acg ggg gag ggg gag cgg ctc 754
Glu Ala Thr Leu Asp Thr Leu Ala Glu Thr Gly Glu Gly Glu Arg Leu
180 185 190

45 ctg cag cgc gcc atc gcg gag cag cag ggg aga ggg gag gtg ctg ggc 802
Leu Gln Arg Ala Ile Ala Glu Gln Gln Gly Arg Gly Glu Val Leu Gly
195 200 205 210

gtg gtg gcg gag atc cag gag cgg cac ggc gcc gtg gcg gac ctg gag 850
Val Val Ala Glu Ile Gln Glu Arg Arg His Gly Ala Val Ala Asp Leu Glu
215 220 225

50 cgg tcc ctg ctg gag ctg cag cag gtg ttc aac gac atg gcc gtg ctg 898
Arg Ser Leu Leu Glu Leu Gln Gln Val Phe Asn Asp Met Ala Val Leu
230 235 240

55 gtg gcg gcg cag ggg gag cag ctg gac gac atc gag ggc cac gtc ggg 946
Val Ala Ala Gln Gly Glu Gln Leu Asp Asp Ile Glu Gly His Val Gly
245 250 255

EP 2 081 954 B1

	cgg	gcg	agg	tcg	ttc	gtc	gac	cgc	ggg	cgc	gag	cag	ctg	cag	gtg	gca	994
	Arg	Ala	Arg	Ser	Phe	Val	Asp	Arg	Gly	Arg	Glu	Gln	Leu	Gln	Val	Ala	
		260					265					270					
5	cgc	aag	cac	cag	aag	agc	tcc	cgc	aag	tgg	acc	ttc	atc	ggc	atc	ggc	1042
	Arg	Lys	His	Gln	Lys	Ser	Ser	Arg	Lys	Trp	Thr	Phe	Ile	Gly	Ile	Gly	
	275					280					285					290	
	atc	ctg	ctc	gtc	gtc	atc	ctc	atc	atc	gtc	atc	ccc	atc	gtg	ctc	aag	1090
	Ile	Leu	Leu	Val	Val	Ile	Leu	Ile	Ile	Val	Ile	Pro	Ile	Val	Leu	Lys	
10					295					300					305		
	aac	acc	aac	aag	agc	aac	aac	aac	aac	agc	cag	cag	tagtggtagg				1136
	Asn	Thr	Asn	Lys	Ser	Asn	Asn	Asn	Asn	Ser	Gln	Gln					
				310					315								
15	aacagcctgt	ggatctggtg	tctgtctctg	atgatcctgg	tcctggattg	cttcctggtt	1196										
	gttggtggtg	attgtctttt	gtggaatttt	ttgcgattgt	aattactcca	tccatgtggt	1256										
	tcgttgagcc	actcgattat	tatttcatga	ctatata			1293										
20	<210>	40															
	<211>	318															
	<212>	PRT															
	<213>	Hordeum vulgare															
25	<400>	40															
30																	
35																	
40																	
45																	
50																	
55																	

EP 2 081 954 B1

Met Asn Asn Leu Phe Ser Ser Ser Trp Lys Arg Ala Gly Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Asp Gly Asp Leu Glu Ser Gly Gly Gly Gly Val Glu Met Thr Ala Pro
 5 20 25 30
 Pro Gly Ala Ala Ala Gly Ala Ser Leu Asp Arg Phe Phe Glu Asp Val
 35 40 45
 Glu Ser Ile Lys Asp Asp Leu Arg Glu Leu Glu Arg Ile Gln Arg Ser
 50 55 60
 Leu His Asp Gly Asn Glu Ser Gly Lys Ser Leu His Asp Ala Ser Ala
 65 70 75 80
 Val Arg Ala Leu Arg Ser Arg Met Asp Ala Asp Val Ala Ala Ala Ile
 85 90 95
 Lys Lys Ala Lys Val Val Lys Leu Arg Leu Glu Ser Leu Asp Arg Ala
 100 105 110
 Asn Ala Ala Asn Arg Ser Val Ala Gly Cys Gly Pro Gly Ser Ser Thr
 115 120 125
 Asp Arg Thr Arg Thr Ser Val Val Ala Gly Leu Arg Lys Lys Leu Arg
 130 135 140
 Asp Ala Met Glu Ser Phe Ser Ser Leu Arg Ser Arg Ile Thr Ser Glu
 145 150 155 160
 Tyr Arg Glu Thr Val Ala Arg Arg Tyr Phe Thr Val Thr Gly Ser Gln
 165 170 175
 Pro Asp Glu Ala Thr Leu Asp Thr Leu Ala Glu Thr Gly Glu Gly Glu
 180 185 190
 Arg Leu Leu Gln Arg Ala Ile Ala Glu Gln Gln Gly Arg Gly Glu Val
 195 200 205
 Leu Gly Val Val Ala Glu Ile Gln Glu Arg His Gly Ala Val Ala Asp
 210 215 220
 Leu Glu Arg Ser Leu Leu Glu Leu Gln Gln Val Phe Asn Asp Met Ala
 225 230 235 240
 Val Leu Val Ala Ala Gln Gly Glu Gln Leu Asp Asp Ile Glu Gly His
 245 250 255
 Val Gly Arg Ala Arg Ser Phe Val Asp Arg Gly Arg Glu Gln Leu Gln
 260 265 270
 Val Ala Arg Lys His Gln Lys Ser Ser Arg Lys Trp Thr Phe Ile Gly
 275 280 285
 Ile Gly Ile Leu Leu Val Val Ile Leu Ile Ile Val Ile Pro Ile Val
 290 295 300
 Leu Lys Asn Thr Asn Lys Ser Asn Asn Asn Asn Ser Gln Gln
 305 310 315

<210> 41

<211> 948

<212> DNA

55 <213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

EP 2 081 954 B1

<222> (1)..(945)

<223> coding for Arabidopsis thaliana syntaxin 121 (SYP121) / syntaxin-related protein (SYR1) (At3g11820)

<400> 41

5

atg gcg aat ccc gcg gga tca acc ggt ggt gtg aac ctc gac aag ttc 48
Met Ala Asn Pro Ala Gly Ser Thr Gly Gly Val Asn Leu Asp Lys Phe
1 5 10 15

10

ttc gaa gat gtt gaa tct gtg aaa gaa gag cta aag gag cta gat cgg 96
Phe Glu Asp Val Glu Ser Val Lys Glu Glu Leu Lys Glu Leu Asp Arg
20 25 30

15

ctc aac gaa aca ctc tct tca tgt cac gag cag agc aag acg ctt cac 144
Leu Asn Glu Thr Leu Ser Ser Cys His Glu Gln Ser Lys Thr Leu His
35 40 45

20

aat gct aaa gcc gtt aaa gat ctc cgg tct aaa atg gac ggt gac gtt 192
Asn Ala Lys Ala Val Lys Asp Leu Arg Ser Lys Met Asp Gly Asp Val
50 55 60

25

gga gtc gcg ttg aag aag gcg aag atg att aaa gtt aaa ctc gag gcg 240
Gly Val Ala Leu Lys Lys Ala Lys Met Ile Lys Val Lys Leu Glu Ala
65 70 75 80

30

cta gat cgt gcc aat gct gct aat cgg agt ctc cct ggc tgt gga cct 288
Leu Asp Arg Ala Asn Ala Ala Asn Arg Ser Leu Pro Gly Cys Gly Pro
85 90 95

35

ggt tct tcc tcc gat cga acc agg acc tct gtc ctc aat ggt ctc agg 336
Gly Ser Ser Ser Asp Arg Thr Arg Thr Ser Val Leu Asn Gly Leu Arg
100 105 110

40

aag aaa ttg atg gac tct atg gat agt ttc aac cga ttg agg gag ctt 384
Lys Lys Leu Met Asp Ser Met Asp Ser Phe Asn Arg Leu Arg Glu Leu
115 120 125

45

atc tcg tcc gag tat aga gaa act gta cag agg agg tac ttc acc gtc 432
Ile Ser Ser Glu Tyr Arg Glu Thr Val Gln Arg Arg Tyr Phe Thr Val

50

55

EP 2 081 954 B1

	130					135					140						
5	acc	gag	gag	aat	ccg	gat	gaa	cga	acc	cta	gat	cga	ctg	att	tcc	act	480
	Thr	Gly	Glu	Asn	Pro	Asp	Glu	Arg	Thr	Leu	Asp	Arg	Leu	Ile	Ser	Thr	
	145					150					155					160	
	gga	gag	agt	gag	aga	ttc	ttg	cag	aaa	gca	ata	caa	gaa	caa	gga	aga	528
	Gly	Glu	Ser	Glu	Arg	Phe	Leu	Gln	Lys	Ala	Ile	Gln	Glu	Gln	Gly	Arg	
					165					170					175		
10	gga	agg	gtg	tta	gac	acc	att	aac	gag	att	caa	gaa	agg	cat	gat	gcg	576
	Gly	Arg	Val	Leu	Asp	Thr	Ile	Asn	Glu	Ile	Gln	Glu	Arg	His	Asp	Ala	
				180					185					190			
	ggt	aaa	gac	att	gag	aag	aat	ctc	agg	gag	ctt	cac	cag	gtg	ttt	cta	624
	Val	Lys	Asp	Ile	Glu	Lys	Asn	Leu	Arg	Glu	Leu	His	Gln	Val	Phe	Leu	
15			195					200					205				
	gac	atg	gcc	gtg	ctg	gta	gag	cac	cag	gga	gct	cag	ctt	gat	gac	atc	672
	Asp	Met	Ala	Val	Leu	Val	Glu	His	Gln	Gly	Ala	Gln	Leu	Asp	Asp	Ile	
		210					215					220					
20	gag	agt	cat	gtg	ggt	cga	gct	agc	tcc	ttt	atc	aga	ggc	gga	act	gac	720
	Glu	Ser	His	Val	Gly	Arg	Ala	Ser	Ser	Phe	Ile	Arg	Gly	Gly	Thr	Asp	
	225					230					235					240	
	cag	cta	caa	acc	gct	cgg	ggt	tac	cag	aag	aac	acg	cga	aaa	tgg	aca	768
	Gln	Leu	Gln	Thr	Ala	Arg	Val	Tyr	Gln	Lys	Asn	Thr	Arg	Lys	Trp	Thr	
25				245						250					255		
	tgt	att	gcc	att	att	att	ctc	atc	atc	atc	ata	act	ggt	gtg	ggt	ctt	816
	Cys	Ile	Ala	Ile	Ile	Ile	Leu	Ile	Ile	Ile	Ile	Thr	Val	Val	Val	Leu	
				260				265						270			
30	gct	ggt	tta	aaa	ccg	tgg	aac	aac	agc	agt	ggc	ggc	ggc	ggc	ggt	ggt	864
	Ala	Val	Leu	Lys	Pro	Trp	Asn	Asn	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	
			275					280					285				
	ggt	ggt	ggg	ggt	acc	act	gga	gga	agt	caa	cca	aat	tca	ggg	aca	cca	912
	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Thr	Gly	Gly	Ser	Gln	Pro	Asn	Ser	Gly	Thr	Pro	
		290					295					300					
35	cca	aat	cct	cct	cag	gca	agg	cg	cta	ttg	cg	tga					948
	Pro	Asn	Pro	Pro	Gln	Ala	Arg	Arg	Leu	Leu	Arg						
	305					310					315						

<210> 42

40 <211> 315

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

45 <400> 42

50

55

EP 2 081 954 B1

Met Ala Asn Pro Ala Gly Ser Thr Gly Gly Val Asn Leu Asp Lys Phe
 1 5 10
 Phe Glu Asp Val Glu Ser Val Lys Glu Glu Leu Lys Glu Leu Asp Arg
 5 20 30
 Leu Asn Glu Thr Leu Ser Ser Cys His Glu Gln Ser Lys Thr Leu His
 35 40 45
 Asn Ala Lys Ala Val Lys Asp Leu Arg Ser Lys Met Asp Gly Asp Val
 10 50 55 60
 Gly Val Ala Leu Lys Lys Ala Lys Met Ile Lys Val Lys Leu Glu Ala
 65 70 75 80
 Leu Asp Arg Ala Asn Ala Ala Asn Arg Ser Leu Pro Gly Cys Gly Pro
 15
 85 90 95
 Gly Ser Ser Ser Asp Arg Thr Arg Thr Ser Val Leu Asn Gly Leu Arg
 100 105
 Lys Lys Leu Met Asp Ser Met Asp Ser Phe Asn Arg Leu Arg Glu Leu
 115 120 125
 Ile Ser Ser Glu Tyr Arg Glu Thr Val Gln Arg Arg Tyr Phe Thr Val
 130 135 140
 Thr Gly Glu Asn Pro Asp Glu Arg Thr Leu Asp Arg Leu Ile Ser Thr
 145 150 155 160
 Gly Glu Ser Glu Arg Phe Leu Gln Lys Ala Ile Gln Glu Gln Gly Arg
 165 170 175
 Gly Arg Val Leu Asp Thr Ile Asn Glu Ile Gln Glu Arg His Asp Ala
 180 185 190
 Val Lys Asp Ile Glu Lys Asn Leu Arg Glu Leu His Gln Val Phe Leu
 195 200 205
 Asp Met Ala Val Leu Val Glu His Gln Gly Ala Gln Leu Asp Asp Ile
 210 215 220
 Glu Ser His Val Gly Arg Ala Ser Ser Phe Ile Arg Gly Gly Thr Asp
 225 230 235 240
 Gln Leu Gln Thr Ala Arg Val Tyr Gln Lys Asn Thr Arg Lys Trp Thr
 245 250 255
 Cys Ile Ala Ile Ile Ile Leu Ile Ile Ile Ile Thr Val Val Val Leu
 260 265 270
 Ala Val Leu Lys Pro Trp Asn Asn Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly
 275 280 285
 Gly Gly Gly Gly Thr Thr Gly Gly Ser Gln Pro Asn Ser Gly Thr Pro
 290 295 300
 Pro Asn Pro Pro Gln Ala Arg Arg Leu Leu Arg
 305 310 315

<210> 43

<211> 1275

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<220>

EP 2 081 954 B1

<221> CDS

<222> (80)..(1006)

<223> coding for Hordeum vulgare subsp. vulgare SNAP-34

5 <400> 43

```

          ggcccctcca cccacccca cccagtcgct gcggatactt gattctgcta ctcggccagc 60
10      gatcgatctc gcctccgcc atg agc gcc acc agg ccc tcc ttc ttc ccc tcc 112
           Met Ser Ala Thr Arg Pro Ser Phe Phe Pro Ser
           1           5           10
15      aac aac aac agg aac aag ccc gcc acc cgg aac ccc ttc gac tcc gac 160
           Asn Asn Asn Arg Asn Lys Pro Ala Thr Arg Asn Pro Phe Asp Ser Asp
           15           20           25
20      tcg gac gac gac ggc ggc atg gcc cgg cgc ggc ccg gcg cgg gcc tcg 208
           Ser Asp Asp Asp Gly Gly Met Ala Arg Arg Gly Pro Ala Arg Ala Ser

```

20

25

30

35

40

45

50

55

EP 2 081 954 B1

	30				35				40								
5	tcc Ser	gtc Val 45	ccg Pro	acc Thr	ccc Pro	gcc Ala	gcg Ala 50	ggg Gly	ccg Pro	gcc Ala	agg Arg	gcc Ala 55	tcc Ser	tcg Ser	gcc Ala	ccg Pro	256
10	atc Ile 60	ccc Pro	gcc Ala	gac Asp	gag Glu	gcg Ala 65	gac Asp	cag Gln	cgg Arg	ggc Gly	gcc Ala 70	ctg Leu	ttc Phe	ggc Gly	gcg Ala	ggc Gly 75	304
15	ccc Pro	gcg Ala	ccg Pro	tcc Ser	ggc Gly 80	ttc Phe	gcg Ala	tcc Ser	tcc Ser	tcc Ser 85	tcc Ser	gcg Ala	gcc Ala	gcc Ala	agg Arg 90	ggc Gly	352
20	cgg Arg	tac Tyr	agg Arg	aac Asn 95	gac Asp	ttc Phe	cgc Arg	gac Asp	tcg Ser 100	ggc Gly	ggc Gly	gtg Val	gag Glu	gcg Ala 105	cag Gln	tcc Ser	400
25	gtg Val	cag Gln	gag Glu 110	ctc Leu	gag Glu	ggc Gly	tac Tyr	gcg Ala 115	gcc Ala	tac Tyr	aag Lys	gcc Ala 120	gag Glu	gag Glu	acc Thr	acg Thr	448
30	cgc Arg	cgg Arg 125	gtc Val	gac Asp	ggc Gly	tgc Cys	ctc Leu 130	cgg Arg	gtc Val	gcc Ala	gag Glu	gag Glu 135	atg Met	cgg Arg	gac Asp	acc Thr	496
35	gcg Ala 140	tca Ser	aag Lys	acc Thr	ctg Leu	ctc Leu 145	cag Gln	gtg Val	cac His	cag Gln	cag Gln 150	ggc Gly	cag Gln	cag Gln	atc Ile	agg Arg 155	544
40	cgc Arg	acc Thr	cac His	gcc Ala	atg Met 160	gcc Ala	gtc Val	gac Asp	atc Ile	gac Asp 165	cag Gln	gat Asp	ctc Leu	tcc Ser	agg Arg 170	ggg Gly	592
45	gaa Glu	aag Lys	cta Leu 175	cta Leu	ggt Gly	gat Asp	ctt Leu	ggt Gly 180	ttg Leu	ttt Phe	tcc Ser	aag Lys	aag Lys 185	tgg Trp	aag Lys	640	
50	cca Pro	aag Lys	aag Lys 190	aac Asn	ggc Gly	gca Ala	atc Ile	agg Arg 195	ggc Gly	cct Pro	atg Met	ctg Leu	acc Thr 200	aga Arg	gac Asp	gat Asp	688
55	tcc Ser	ttc Phe 205	ata Ile	cgc Arg	aag Lys	ggc Gly	agc Ser 210	cat His	atg Met	gag Glu	cag Gln	agg Arg 215	cat His	aaa Lys	ctg Leu	ggg Gly	736
60	ctg Leu 220	tca Ser	gat Asp	cgt Arg	ccg Pro	cat His 225	cga Arg	tcc Ser	aat Asn	gca Ala	cgc Arg 230	cag Gln	ttc Phe	cta Leu	tct Ser	gaa Glu 235	784
65	ccc Pro	aca Thr	tca Ser	ggc Gly	ctt Leu 240	gag Glu	aaa Lys	gtc Val	gag Glu	gtg Val 245	gag Glu	aag Lys	gca Ala	aag Lys	cag Gln 250	gat Asp	832
70	gat Asp	ggc Gly	ctg Leu	tct Ser 255	gac Asp	ctt Leu	agc Ser	gac Asp	ata Ile 260	ctg Leu	aca Thr	gag Glu	ttg Leu	aaa Lys 265	gga Gly	atg Met	880
75	gcc Ala	att Ile	gac Asp 270	atg Met	gga Gly	act Thr	gag Glu	att Ile 275	gag Glu	ggg Gly	caa Gln	aca Thr	aag Lys 280	gat Asp	ctt Leu	ggt Gly	928
80	cat His 285	gcg Ala	gag Glu	aag Lys	gac Asp	ttt Phe 290	gac Asp	gaa Glu	ctt Leu	aac Asn	tac Tyr	agg Arg 295	gtc Val	aag Lys	ggg Gly	gca Ala	976
85	aac Asn 300	gct Ala	cga Arg	aca Thr	cg Arg 305	ctg Leu	ctt Leu	ggc Gly	aga Arg	taggcaagaa gcatatgttg							1026

EP 2 081 954 B1

ttcaccagag gattctgtga cactccttat cttctgcatt tgctttcgtg ggctgttaat 1086
 tcagatcatt ttgtgcataa aactctgggt aggaaggctt gttggggagt tgtatcaggg 1146
 5 tttattgtgt atatacgcta gacgggCGGT tcgttttcta tgttgcagtt gtactacatt 1206
 tgctatggac agtagatagc tttgtattcg gttttcttgt tttgcaatcg ctatgctgca 1266
 ggaaagcac 1275

10 <210> 44
 <211> 309
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

15 <400> 44

Met₁ Ser Ala Thr Arg₅ Pro Ser Phe Phe Pro₁₀ Ser Asn Asn Asn Arg₁₅ Asn
 20 Lys Pro Ala Thr₂₀ Arg Asn Pro Phe Asp₂₅ Ser Asp Ser Asp₃₀ Asp Asp Gly
 Gly Met Ala₃₅ Arg Arg Gly Pro Ala₄₀ Arg Ala Ser Ser Val₄₅ Pro Thr Pro
 25 Ala Ala₅₀ Gly Pro Ala Arg Ala₅₅ Ser Ser Ala Pro Ile₆₀ Pro Ala Asp Glu
 Ala₆₅ Asp Gln Arg Gly Ala₇₀ Leu Phe Gly Ala Gly₇₅ Pro Ala Pro Ser Gly₈₀
 30 Phe Ala Ser Ser₈₅ Ser Ala Ala Ala Arg₉₀ Gly Arg Tyr Arg Asn₉₅ Asp
 Phe Arg Asp Ser₁₀₀ Gly Gly Val Glu Ala₁₀₅ Gln Ser Val Gln Glu Leu Glu
 35 Gly Tyr Ala₁₁₅ Ala Tyr Lys Ala Glu₁₂₀ Glu Thr Thr Arg Arg₁₂₅ Val Asp Gly
 Cys Leu Arg Val Ala Glu Glu₁₃₅ Met Arg Asp Thr Ala₁₄₀ Ser Lys Thr Leu
 40 Leu Gln Val His Gln Gln Gly Gln Gln Ile Arg₁₅₅ Arg Thr His Ala Met₁₆₀
 Ala Val Asp Ile Asp₁₆₅ Gln Asp Leu Ser Arg₁₇₀ Gly Glu Lys Leu Leu Gly₁₇₅
 45 Asp Leu Gly Gly₁₈₀ Leu Phe Ser Lys Lys₁₈₅ Trp Lys Pro Lys Lys₁₉₀ Asn Gly
 Ala Ile Arg₁₉₅ Gly Pro Met Leu Thr Arg Asp Asp Ser Phe₂₀₅ Ile Arg Lys
 50 Gly Ser His Met Glu Gln Arg₂₁₅ His Lys Leu Gly Leu₂₂₀ Ser Asp Arg Pro
 His Arg Ser Asn Ala Arg₂₃₀ Gln Phe Leu Ser Glu₂₃₅ Pro Thr Ser Gly Leu₂₄₀
 55 Glu Lys Val Glu₂₄₅ Val Glu Lys Ala Lys Gln₂₅₀ Asp Asp Gly Leu Ser Asp₂₅₅
 Leu Ser Asp Ile₂₆₀ Leu Thr Glu Leu Lys₂₆₅ Gly Met Ala Ile Asp₂₇₀ Met Gly

EP 2 081 954 B1

Thr Glu Ile Glu Gly Gln Thr Lys Asp Leu Gly His Ala Glu Lys Asp
 275 280 285

Phe Asp Glu Leu Asn Tyr Arg Val Lys Gly Ala Asn Ala Arg Thr Arg
 290 295 300

Arg Leu Leu Gly Arg
 305

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

<210> 45
 <211> 1398
 <212> DNA
 <213> Glycine max

<220>
 <221> CDS
 <222> (212)..(946)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> <1367>..<1367>
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> <1368>..<1368>
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> <1369>..<1369>
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> <1370>..<1370>
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> <1371>..<1371>
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> <1372>..<1372>
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> <1373>..<1373>
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> <1374>..<1374>
 <223> n is a, c, g, or t

<220>

<221> misc_feature
<222> <1375>..<<1375>
<223> n is a, c, g, or t

5 <220>
<221> misc_feature
<222> <1376>..<<1376>
<223> n is a, c, g, or t

10 <220>
<221> misc_feature
<222> <1377>..<<1377>
<223> n is a, c, g, or t

15 <220>
<221> misc_feature
<222> <1378>..<<1378>
<223> n is a, c, g, or t

20 <220>
<221> misc_feature
<222> <1379>..<<1379>
<223> n is a, c, g, or t

25 <220>
<221> misc_feature
<222> <1380>..<<1380>
<223> n is a, c, g, or t

30 <220>
<221> misc_feature
<222> <1381>..<<1381>
<223> n is a, c, g, or t

35 <220>
<221> misc_feature
<222> <1382>..<<1382>
<223> n is a, c, g, or t

40 <220>
<221> misc_feature
<222> <1383>..<<1383>
<223> n is a, c, g, or t

45 <220>
<221> misc_feature
<222> <1384>..<<1384>
<223> n is a, c, g, or t

50 <400> 45

55

EP 2 081 954 B1

	ggaatttccg tggcgacca tcggacgctc gtccgacgca tcaacactac ggccgactgg	60
5	aggcgacttg aatgaaaggg aggtaatctt aagtggaacc gtttgcaaaa ttaccgcttc	120
	ctcgtacctc gaatgcagtc taaacttggg gtcgctgaag tcacagccat atacgacact	180
10	agacatatat gttgtgtctcc gattgcaagc a atg gac tcc ttc aat tcc ttc	232
	Met Asp Ser Phe Asn Ser Phe	
	1 5	
	ttc gat tca aca aac cga tgg aat tac gat act ctc aaa aac ttc cgt	280
	Phe Asp Ser Thr Asn Arg Trp Asn Tyr Asp Thr Leu Lys Asn Phe Arg	
	10 15 20	
15	caa att tct ccg gtc gtt cag aat cac ctc aag cag gtt tat ttt act	328
	Gln Ile Ser Pro Val Val Gln Asn His Leu Lys Gln Val Tyr Phe Thr	
	25 30 35	
	ctg tgt ttc gcc gtg gtt gct gcg gct gtt ggg gct tac ctt cat gtc	376
	Leu Cys Phe Ala Val Val Ala Ala Ala Val Gly Ala Tyr Leu His Val	
	40 45 50 55	
20	ctc ttg aac att ggg ggt ttt ctt act aca gtg gca tgc gtg gga agc	424
	Leu Leu Asn Ile Gly Gly Phe Leu Thr Thr Val Ala Cys Val Gly Ser	
	60 65 70	
	agt gtt tgg tta ctc tcg aca cct cct ttt gaa gag agg aaa aga gtg	472
	Ser Val Trp Leu Leu Ser Thr Pro Pro Phe Glu Glu Arg Lys Arg Val	
	75 80 85	
25	act ttg ttg atg gcc gca tca ctg ttt cag ggt gcc tct att gga ccc	520
30		
35		
40		
45		
50		
55		

EP 2 081 954 B1

Thr Leu Leu Met Ala Ala Ser Leu Phe Gln Gly Ala Ser Ile Gly Pro
 90 95 100
 ttg ata gat ttg gct att caa atc gat cca agc ctt atc ttt agt gca 568
 Leu Ile Asp Leu Ala Ile Gln Ile Asp Pro Ser Leu Ile Phe Ser Ala
 105 110 115
 ttt gtg gga aca tcc ttg gcc ttt gca tgc ttc tca gga gca gct ttg 616
 Phe Val Gly Thr Ser Leu Ala Phe Ala Cys Phe Ser Gly Ala Ala Leu
 120 125 130 135
 gtt gct agg cgt agg gag tac ctg tac ctt ggt ggc ttg gtt tct tct 664
 Val Ala Arg Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Leu Gly Gly Leu Val Ser Ser
 140 145 150
 gga ttg tcc atc ctt ctc tgg ttg cac ttt gct tct tcc atc ttt gga 712
 Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu His Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly
 155 160 165
 ggc tca aca gct ctc ttt aag ttt gag ttg tac ttt ggg cta ttg gtg 760
 Gly Ser Thr Ala Leu Phe Lys Phe Glu Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Val
 170 175 180
 ttt gta ggt tac att gta gta gac acc caa gaa ata gtt gag agg gca 808
 Phe Val Gly Tyr Ile Val Val Asp Thr Gln Glu Ile Val Glu Arg Ala
 185 190 195
 cac ttg ggc gat ctg gac tat gta aag cat gcc ttg acc ttg ttt acc 856
 His Leu Gly Asp Leu Asp Tyr Val Lys His Ala Leu Thr Leu Phe Thr
 200 205 210 215
 gat ttg gtc gca gtt ttt gtc cgg att ctt gtt att atg ttg aag aat 904
 Asp Leu Val Ala Val Phe Val Arg Ile Leu Val Ile Met Leu Lys Asn
 220 225 230
 tcg act gag agg aat gag aag aaa aag aag aga aga gat tga ttttcttacc 956
 Ser Thr Glu Arg Asn Glu Lys Lys Lys Lys Arg Arg Asp
 235 240
 aatctgctcg attaacactt cacctcgctt ggtctgtaat acataaaaac agccgtctat 1016
 acagtgtttt ccacttttta agcttgctcc tcctactgtg cagttaagtc gtttgtttac 1076
 caatagtaca tgttgacatg ttttgagctc tctaataaga gaaatgttta cattacattt 1136
 gttttaaaga tgaaaagggg agtggggaag aagtcgatgg tgaagggtccc taataaattc 1196
 ttactcccaa gactcagaat ttttcttggg gaggaagtgg aattcagggg aacacttttt 1256
 tttcacacat tattgagtat attttatact agactcgcca aatcacgaat ttcattatct 1316
 atttagcttc ttttttttcc ccctgtaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa nnnnnnnnnn 1376
 nnnnnnnnaa aaaaaaaaaa aa 1398

<210> 46
 <211> 244
 <212> PRT
 <213> Glycine max

<400> 46

Met Asp Ser Phe Asn Ser Phe Phe Asp Ser Thr Asn Arg Trp Asn Tyr
 1 5 10 15
 Asp Thr Leu Lys Asn Phe Arg Gln Ile Ser Pro Val Val Gln Asn His
 20 25 30
 Leu Lys Gln Val Tyr Phe Thr Leu Cys Phe Ala Val Val Ala Ala Ala
 35 40 45
 Val Gly Ala Tyr Leu His Val Leu Leu Asn Ile Gly Gly Phe Leu Thr
 50 55 60
 Thr Val Ala Cys Val Gly Ser Ser Val Trp Leu Leu Ser Thr Pro Pro

EP 2 081 954 B1

65 Phe Glu Glu Arg Lys Arg Val Thr Leu Leu Met Ala Ala Ser Leu Phe 80
 85 Ile Gly Pro Leu Ile Asp Leu Ala Ile Gln Ile Asp 95
 5 Gln Gly Ala Ser Ile Gly Pro Leu Ile Asp Leu Ala Ile Gln Ile Asp 100
 105 Val Gly Thr Ser Leu Ala Phe Ala 110
 115 Phe Ser Ala Phe Val Gly Thr Ser Leu Ala Phe Ala 125
 130 Cys Phe Ser Gly Ala Ala Leu Val Ala Arg Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr 140
 145 Leu Gly Gly Leu Val Ser Ser Gly Leu Ser Ile Leu Leu Trp Leu His 155
 10 Phe Ala Ser Ser Ile Phe Gly Gly Ser Thr Ala Leu Phe Lys Phe Glu 160
 165 Leu Tyr Phe Gly Leu Leu Val Phe Val Gly Tyr Ile Val Val Asp Thr 175
 180 Gln Glu Ile Val Glu Arg Ala His Leu Gly Asp Leu Asp Tyr Val Lys 190
 15 His Ala Leu Thr Leu Phe Thr Asp Leu Val Ala Val Phe Val Arg Ile 205
 210 Leu Val Ile Met Leu Lys Asn Ser Thr Glu Arg Asn Glu Lys Lys Lys 220
 225 Lys Arg Arg Asp 230 235 240

20 <210> 47
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

25 <220>
 <223> GFP-Primer 1

30 <400> 47
 atggtgagca agggcgagga 20

35 <210> 48
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> GFP-Primer 2

40 <400> 48
 ttgacaacg atgtgcaaga ctctgtac agctgtcca tgc 43
 PF 58494
 92

45 **Patentansprüche**

50 1. Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung einer Resistenz gegen mindestens einen biotrophen Pilz aus dem Genus Phakopsora in einer Pflanze oder einem Teil einer Pflanze, wobei der Teil einer Pflanze ein Gewebe oder eine Zelle umfasst, umfassend die Schritte:

(a) Erhöhung der Proteinmenge oder -funktion mindestens eines Bax Inhibitor-1 (BI1) Proteins in der Pflanze oder mindestens einem Teil einer Pflanze, gegenüber der Proteinmenge oder -funktion in der Ausgangspflanze oder in deren Teil, wobei

55 (i) pflanzliche Zellen stabil mit einer rekombinanten Expressionskassette transformiert werden, welche eine für ein BI1-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz in funktioneller Verknüpfung mit einem Promotor enthält, wobei der Promotor in Bezug auf die das BI1-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz heterolog ist;

- (ii) die Pflanze aus der pflanzlichen Zellen regeneriert wird; und
 (iii) die für das BI1-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz in einer Menge, in mindestens einem Gewebe und für eine Zeit, hinreichend um eine Pilzresistenz gegen mindestens einen biotrophen Pilz aus dem Genus Phakopsora in der Pflanze zu erzeugen oder zu erhöhen, exprimiert wird
 und

(b) Auswahl der Pflanze oder eines Teils einer Pflanze, bei der/dem im Vergleich zur Ausgangspflanze bzw. deren Teil eine Resistenz gegen mindestens einen biotrophen Pilz aus dem Genus Phakopsora erzeugt oder erhöht wurde, wobei
 das BI1-Protein kodiert durch ein Polypeptid, das mindestens eine Sequenz umfaßt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- (a) den Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, oder, 38; und
 (b) Sequenzen, die eine Identität von mindestens 70% zu einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, oder 38 aufweisen,
 wobei die Pflanze Soja ist

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das BI1 Protein mindestens eine Sequenz umfaßt, die eine Identität von mindestens 80% aufweist zu mindestens einem BI1-Konsensusmotiv ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- (a) H(L/I)KXVY,
 (b) AXGA(Y/F)XH,
 (c) NIGG,
 (d) P(V/P)(Y/F)E(E/Q)(R/Q)KR,
 (e) (E/Q)G(A/S)S(V/I)GPL,
 (f) DP(S/G)(L/I)(I/L),
 (g) V(G/A)T(A/S)(L/I)AF(A/G)CF(S/T),
 (h) YL(Y/F)LGG,
 (i) L(L/V)SS(G/W)L(S/T)(I/M)L(L/M)W, und
 (j) DTGX(I/V)(I/V)E.

3. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei der heterologe Promotor ein gewebespezifischer Promotor ist.

4. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Expression des BI1 Proteins in einer Pflanze zumindest in der Epidermis, bevorzugt im wesentlichen gewebespezifisch in der Epidermis erhöht wird und/oder im Mesophyll im wesentlichen nicht erhöht wird.

5. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Pflanze zudem einen mloresistenten Phänotyp aufweist, oder die Expression oder Funktion von MLO, RacB und/oder NaOx mindestens in der Epidermis inhibiert oder im Vergleich zu einer Kontrollpflanze reduziert ist und/oder die Expression oder Funktion von PEN2, SNAP34 und/oder PEN1 mindestens in der Epidermis erhöht ist, im Vergleich zu einer Kontrollpflanze.

Claims

1. A method of generating or increasing a resistance to at least one biotrophic fungus from the genus Phakopsora in a plant or a part of a plant, where the part of a plant comprises a tissue or a cell, comprising the following steps:

a) increasing the protein quantity or function of at least one Bax inhibitor-1 (BI1) protein in the plant or at least a part of a plant over the protein quantity or function in the starting plant or part thereof, where

- (i) plant cells are stably transformed with a recombinant expression cassette comprising a nucleic acid sequence, which codes for a BI1 protein, in operable linkage with a promoter, the promoter being heterologous with regard to the nucleic acid sequence which codes for the BI1 protein;
 (ii) the plant is regenerated from the plant cell; and
 (iii) the nucleic acid sequence which codes for the BI1 protein is expressed in an amount, in at least one tissue and over a period sufficient for generating or increasing a fungal resistance to at least one biotrophic

fungus from the genus Phakopsora in the plant and,

b) selecting the plant or a part of a plant where a resistance to at least one biotrophic fungus from the genus Phakopsora has been generated or increased in comparison with the starting plant or part thereof where the BI1 protein is encoded by a polypeptide which comprises at least one sequence selected from the group consisting of:

a) the sequences as shown in SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 or 38; and
b) sequences with at least 70% identity with one of the sequences as shown in SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 or 38,
where the plant is soya

2. The method according to claim 1, where the BI1 protein comprises at least one sequence which has at least 80% identity with at least one BI1 consensus motif selected from the group consisting of

a) H(L/I)KXVY,
b) AXGA(Y/F)XH,
c) NIGG,
d) P(V/P)(Y/F)E(E/Q)(R/Q)KR,
e) (E/Q)G(A/S)S(V/I)GPL,
f) DP(S/G)(L/I)(I/L),
g) V(G/A)T(A/S)(L/I)AF(A/G)CF(S/T),
h) YL(Y/F)LGG,
i) L(L/V)SS(G/W)L(S/T)(I/M)L(L/M)W, and
j) DTGX(I/V)(I/V)E.

3. The method according to either of the preceding claims, where the heterologous promoter is a tissue-specific promoter.

4. The method according to any of the preceding claims, wherein the expression of the BI1 protein in a plant is increased at least in the epidermis, preferably essentially tissue-specifically in the epidermis, and/or essentially not increased in the mesophyll.

5. The method according to any of the preceding claims, where the plant additionally has an mlo-resistant phenotype, or the expression or function of MLO, RacB and/or NaOx is inhibited or reduced, in comparison with a control plant, at least in the epidermis and/or the expression or function of PEN2, SNAP34 and/or PEN1 is increased at least in the epidermis in comparison with a control plant.

Revendications

1. Procédé de production ou d'augmentation d'une résistance à au moins un champignon biotrophe du genre Phakopsora dans une plante ou une partie d'une plante, la partie d'une plante comprenant un tissu ou une cellule, comprenant les étapes :

(a) augmentation de la quantité ou de la fonction d'au moins une protéine inhibiteur-1 de Bax (BI1) dans la plante ou au moins une partie de la plante, par comparaison avec la quantité ou la fonction de la protéine dans la plante de départ ou dans sa partie,

(i) les cellules végétales subissant une Transformation stable avec une cassette d'expression recombinante, qui contient une séquence d'acide nucléique codant pour une protéine BI1 en liaison fonctionnelle avec un promoteur, le promoteur étant hétérologue par rapport à la séquence d'acide nucléique codant pour la protéine BI1 ;

(ii) la plante subissant une régénération à partir des cellules végétales ; et

(iii) la séquence d'acide nucléotidique codant pour la protéine BI1 étant exprimée en une quantité dans au moins un tissu et pendant un temps suffisant pour produire ou augmenter une résistance fongique à au moins un champignon biotrophe du genre Phakopsora dans la plante,

et

EP 2 081 954 B1

(b) sélection de la plante ou une partie de la plante dans laquelle, par comparaison avec la plante de départ ou sa partie, une résistance à au moins un champignon biotrophe du genre *Phakopsora* a été produite ou augmentée,

la protéine BI1 étant codée par un Polypeptide qui comprend au moins une séquence choisie dans le groupe consistant en :

(a) les séquences selon SEQ ID N° 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 ou 38 ; et

(b) les séquences qui présentent une identité d'au moins 70 % avec l'une des séquences selon SEQ ID N° 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 ou 38,

la plante étant le soja.

2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la protéine BI1 comprend au moins une séquence qui présente une identité d'au moins 80 % avec au moins un motif consensus de BI1 choisi dans le groupe consistant en

(a) H(L/I)KXVY,

(b) AXGA(Y/F)XH,

(c) NIGG,

(d) P(V/P)(Y/F)E(E/Q)(R/Q)KR,

(e) (E/Q)G(A/S)S(V/I)GPL,

(f) DP(S/G)(L/I)(I/L),

(g) V(G/A)T(A/S)(L/I)AF(A/G)CF(S/T),

(h) YL(Y/F)LGG,

(i) L(L/V)SS(G/W)L(S/T)(I/M)L(L/M)W,

et

(j) DTGX(I/V)(I/V)E.

3. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel le promoteur hétérologue est un promoteur spécifique de plante.

4. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel l'expression de la protéine BI1 dans une plante est augmentée au moins dans l'épiderme, de préférence pour l'essentiel d'une manière spécifique de tissu dans l'épiderme, et/ou pour l'essentiel n'est pas augmentée dans le mésophylle.

5. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel la plante comprend en outre un phénotype de résistance MLO, ou l'expression ou la fonction du MLO, du RacB et/ou du NaOx est inhibée au moins dans l'épiderme ou est réduite par comparaison avec une plante témoin, et/ou l'expression ou la fonction du PEN2, du SNAP34 et/ou du PEN1 est augmentée au moins dans l'épiderme, par comparaison avec une plante témoin.

Figur 1a (Seite 1 von 3)

		1		50
AtBI-1	(1)	-----MDAFSSFFDSQPGS---RSWSYDSLKNFRQISPAVQNHLLKR		
BnBI-1	(1)	-----MDSFSSFFDSQPGS---RSWSYDSLKNLRQISPSVQNHLLKR		
GmBI2	(1)	-----RLQAMDAFNSFFDS-----RNRWNYDTLKNFRQISPVVQNHLLKQ		
GmBI3	(1)	ITKTIRFDSLFSMDTFFKSPSSSSSRWSYDTLKNFREISPLVQNHLLK		
HVBI-1	(1)	-----MDAFYSTS---SAAASGWGHDSLKNFRQISPAVQSHLLKL		
NtBI-1	(1)	-----MESCTSFFNSQSASS-RNRWSYDSLKNFRQISPFVQTHLLK		
OsBI-1	(1)	-----MDAFYSTSSAYGAAASGWGYDSLKNFRQISPAVQSHLLKL		
TaBI11	(1)	-----		
TaBI18	(1)	-----FSGTFRNSRSDDFVLCELQRELPRCRDATLTV		
TaBI5 neu	(1)	-----VAMPGR		
ZmBI14	(1)	-----		
ZmBI16	(1)	-----		
ZmBI33	(1)	-----		
ZmBI8	(1)	-----		
Consensus	(1)		F S W YDSLKN R ISP VQ HLK	
		51		100
AtBI-1	(39)	VYLTLCALVASAFGAYLHVLWNIGGILTTIGCIGTMIWLLSCPPYEHQK		
BnBI-1	(39)	VYLTLCALVASAFGAYLHVLWNIGGILTTIGCFGSMIWLLSCPPYEQQK		
GmBI2	(40)	VYFTLCFAVVAAGAYLHVLLNIGGFLLTVACMGSSFWLLSTPPFEERK		
GmBI3	(51)	VYFTLCFAVVAAGAYLHVLLNIGGFLLTLASIGSMFWLLSTPPFEEQK		
HVBI-1	(37)	VYLTLCFALASSAVGAYLHIALNIGGMLTMLACVGTIAWMFVSPVYEERK		
NtBI-1	(41)	VYLSLCCALVASAAGAYLHILWNIGGLTTLGCVGSI VWLMATPLYEEQK		
OsBI-1	(40)	VYLTLCVALAASAVGAYLHVALNIGGMLTMLGCVGSI AWLFSVPVFEERK		
TaBI11	(1)	-----		
TaBI18	(33)	VYVIPIVGRIKSAAGAYLHIALNIGGMLTMLACIGTIAWMFVSPVYEERK		
TaBI5 neu	(7)	RFRLTYALPGLICRGCLPAHCPEHWRDADNARVYRNHRLDVLGASLRGEE		
ZmBI14	(1)	-----GSI AWLFSVPVYEERK		
ZmBI16	(1)	-----WNIGVRLTMLGCI GSI DWLFSVPVYEERK		
ZmBI33	(1)	-----WNIGGTLTMLGCVGSI AWLFSVPVYEERK		
ZmBI8	(1)	-----		
Consensus	(51)	VY TLC AL ASA GAYLHV NIGG LT LGCIGSI WL S PVYEERK		
		101		150
AtBI-1	(89)	RLSLLFVSAVLEGASVGPLIKVAIDVDPSILITAFVGTIAIAFVCFSAAM		
BnBI-1	(89)	RLSLLFLSAVLEGASVGPLIKVAIDFDPSILITAFVGTIAIAFICFSGAAM		
GmBI2	(90)	RVTLLMAASLFQGSIGPLIDLAIHIDPSLIFSAFVGTALAFACFSGAAL		
GmBI3	(101)	RLSLLMASALFQASIGPLIDLAF AIDPGLI IGAFVATSLAFACFSAVAL		
HVBI-1	(87)	RFGLLMGAALLEGASVGPLIELAIDFDPSILVTGFVGTIAIAFGCFSGAAI		
NtBI-1	(91)	RIALLMAAALFKGASIGPLIELAIDFDPSIVIGAFVGCVAFAFGCFSAAM		
OsBI-1	(90)	RFGILLAAALLEGASVGPLIKLAVDFDSSILVTAFVGTIAIAFGCFTCAAI		
TaBI11	(1)	-----AAI		
TaBI18	(83)	RFGLLMGAALLEGASVGPLIELAIDFDPSILVTGFVGTIAIAFGCFSGAAI		
TaBI5 neu	(57)	EVWAADGCSLLEGASVGPLIELAIDFDPSILVTGFVGTIAIAFGCFSGAAI		
ZmBI14	(17)	RYWLLMAAALLEGASVGPLIKLAVEFDPSILVTAFVGTIAIAFACFSCAAM		
ZmBI16	(30)	RYGLLMAAALLEGASVGPLVKLAVEFDPSILVTAFVGTIAIAFACFSGAAM		
ZmBI33	(30)	RYGLLMAAALLEGASVGPLVKLAVEFDPSILVTAFVGTIAIAFACFSGAPW		
ZmBI8	(1)	-----VIDLDSRILVTAFVGTAVAFACFSGAAI		
Consensus	(101)	R LLMAAALLEGASVGPLI LAIDFDPSILVTAFVGTIAIAFACFSGAAI		

Figur 1b (Seite 2 von 3)

		151		200
AtBI-1	(139)	LARRREYLYLGGLLSSGLSMLMWLQFASSIFG-GSASIFKFELYFGLLIF		
BnBI-1	(139)	LARRREYLYLGGLLSSGLSMLMWLQFASSIFG-GSASIFKFELYFGLLIF		
GmBI2	(140)	VARRREYLYLGGLVSSGLSILLWLHFASSIFG-GSTALFKFELYFGLLVF		
GmBI3	(151)	VARRREYLYLGGLLSSWLSILMWLHSDSSLFG-GSIALFKFELYFGLLVF		
HVBI-1	(137)	IARRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFVTSIFGHSS-GSFMFEVYFGLLIF		
NtBI-1	(141)	VARRREYLYLGGLLSSGLSILFWLHFASSIFG-GSMALFKFELYFGLLVF		
OsBI-1	(140)	VAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFAASIFGHST-GSFMFEVYFGLLIF		
TaBI11	(4)	IARRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFATSIFGHSS-GSFMFEVYFGLLIF		
TaBI18	(133)	IARRREYLYLGGLLSSG-----LTIL		
TaBI5 neu	(107)	IARRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFATSIFGHSS-GSFMFEVYFGLLIF		
ZmBI14	(67)	VAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFAASIFGHQSTSSFMFEVYFGLLIF		
ZmBI16	(80)	VARRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQLAASIF-GHSATSFMFELYFGLLIF		
ZmBI33	(80)	WQAR-EYLYLGGCRRGSPSCSGCSSPPSS--ALRNSFMFEVYFGLLIF		
ZmBI8	(29)	IARRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFATSIFGHST-ATFMFEVYFGLLVF		
Consensus	(151)	VAKRREYLYLGGLLSSGLSILLWLQFASSIFG S ASFMFEVYFGLLIF		
		201		250
AtBI-1	(188)	VGVMVVDTQEII EKAHLGDMDYVKHSLTLFTDFVAVFVRILIIIMLKNSAD		
BnBI-1	(188)	VGVMVVDTQDII EKAHLGDMDYVKHSLTLFTDFVAVFVRVLIIMLKNSAD		
GmBI2	(189)	VGIVVDTQEIVERAHLGDLDYVKHALTLFTDLVAVFVRILVIMLKNSTE		
GmBI3	(200)	VGIVVDTQEII ERAHFGDLDYVKHALTLFTDLAAIFVRILIIIMLKNSSE		
HVBI-1	(186)	LGYMVDYDTQEII ERAHGDMDYIKHALTLFTDFVAVLVRVLIIMLKNSAD		
NtBI-1	(190)	VGIIIFDTQDII EKAHLGDLDYVKHALTLFTDFVAVFVRILIIIMLKNSAD		
OsBI-1	(189)	LGYMVDYDTQEII ERAHGDMDYIKHALTLFTDFVAVLVRILVIMLKNSAD		
TaBI11	(53)	LGYMVDYDTQEII ERAHGDMDYIKHALTLFTDFVAVLVRILIIIMLKNSAD		
TaBI18	(154)	L-----		
TaBI5 neu	(156)	LGYMVDYDTQEII ERAHGDMDYIKHALTLFTDFVAVLVRVLIILLKNAAD		
ZmBI14	(117)	LGYMVDYDTQEIVERAHHG-----		
ZmBI16	(129)	LGYVVYDT-----		
ZmBI33	(127)	LG-----		
ZmBI8	(78)	LGYMVDYDTQEII ERAHGDMDYIKHALTLFTDFVAVLVRILVIMMKNAQE		
Consensus	(201)	LGYMVDYDTQEII ERAH GDMDYIKHALTLFTDFVAV VRILIIIMLKNA D		
		251		300
AtBI-1	(238)	KEEKKKKRRN-----GDVK-I-LYGCYRVWPL-RYYLLALSIGDQTCF		
BnBI-1	(238)	KEDKKKKRRN-----D-KVRKKAK-SGCYVCFKK-----KRVG		
GmBI2	(239)	RNEKKKKRRD-----S-----		
GmBI3	(250)	RNEKKKKRRD--ADRPTRAQASLQ-FSLWRIHN-----LFR-CWSLV-		
HVBI-1	(236)	KSEDKKKRKG-----S-----		
NtBI-1	(240)	KEEKKKKRRN---CISGYSKTL-L-NLAFSCS---TSVDLRQVCC--FG		
OsBI-1	(239)	KSEKKKKRKS-ELLFPLCT-EKTTAAIASTYYDRAALQLGFMVNTSSFA		
TaBI11	(103)	KSEDKKKRKS-----		
TaBI18	(155)	-----		
TaBI5 neu	(206)	KVGGQEEEEES-----		
ZmBI14	(135)	-----		
ZmBI16	(137)	-----		
ZmBI33	(129)	-----		
ZmBI8	(128)	KSQDEKKRK-----		
Consensus	(251)	K E KKKRR		

Figur 1c (Seite 3 von 3)

```

                                301                                350
AtBI-1 (278) H-KG-SACFTSAQVPSSDCK-----LECCSSFHKLFFKSL
BnBI-1 (269) VISTDMIALVFFTCLEQFW-----QHTLRICVFLLVTPDCEWI
GmBI2 (249) -----
GmBI3 (288) LVSIVFAVMVNVRISEFKHLHMYLPIS-CVV-HHTLV-KKKKKKKKKKKKK
HVBI-1 (248) -----
NtBI-1 (279) NASD-AARLCYAACQCGYGGT-MVLF----PKHTIK-HACLHYIDNLRVY
OsBI-1 (287) FC-YGVNLLRFVVVVALQILACYMTRIFL-WWSR-SKRENTSSFATNLFA
Consensus (301)

```

```

                                351                                400
AtBI-1 (312) VLLIASYQAKNNVGK-----SCLNFLKCVHFRKKKKKKKKK-----
BnBI-1 (307) SILKLC-KLSVGS-----
GmBI2 (249) -----
GmBI3 (335) KKKKKXXXXXXXXXXXXX--XXXXXGVCGLRYSRHSSNH-EGSLW-PGLC-
HVBI-1 (248) -----
NtBI-1 (322) YLFLLPFAVLGCS-LYS-FSVMLDHLLS-RLISHIDGRNENSHRRPNLFK
OsBI-1 (334) FW-LMMILSPKKKK-----
Consensus (351)

```

```

                                401                                450
AtBI-1 (348) -----
BnBI-1 (319) -----
GmBI2 (249) -----
GmBI3 (380) ACIDTVH-FGCNLCANS-YNVE-FI-EK-EEEEERLIG-PIAMCRVIWFV
HVBI-1 (248) -----
NtBI-1 (369) TEAQL-----
Consensus (401)

```

```

                                451                                500
GmBI3 (424) ENT-LAV-KLLVPLCS--LAMCLL-W-MSGFLLNIFICIC--S-YIV-TS
Consensus (451)

```

```

                                501                                512
GmBI3 (464) FLGLKKEKKKKK
Consensus (501)

```

FIG.2

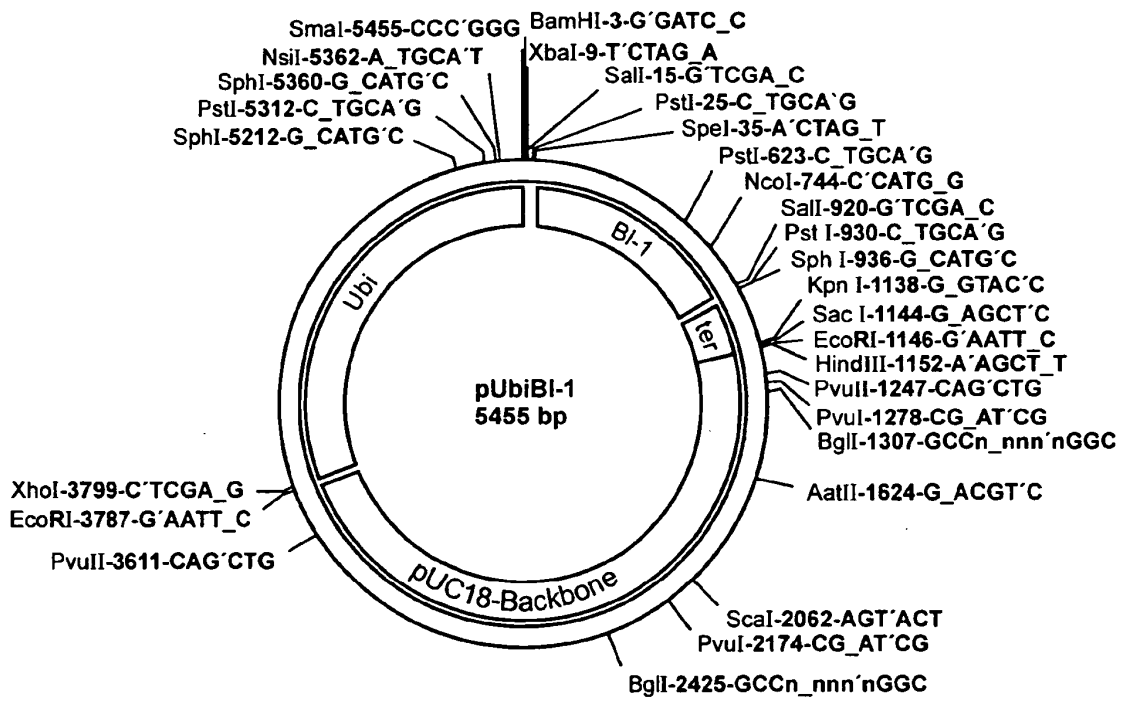


FIG.3

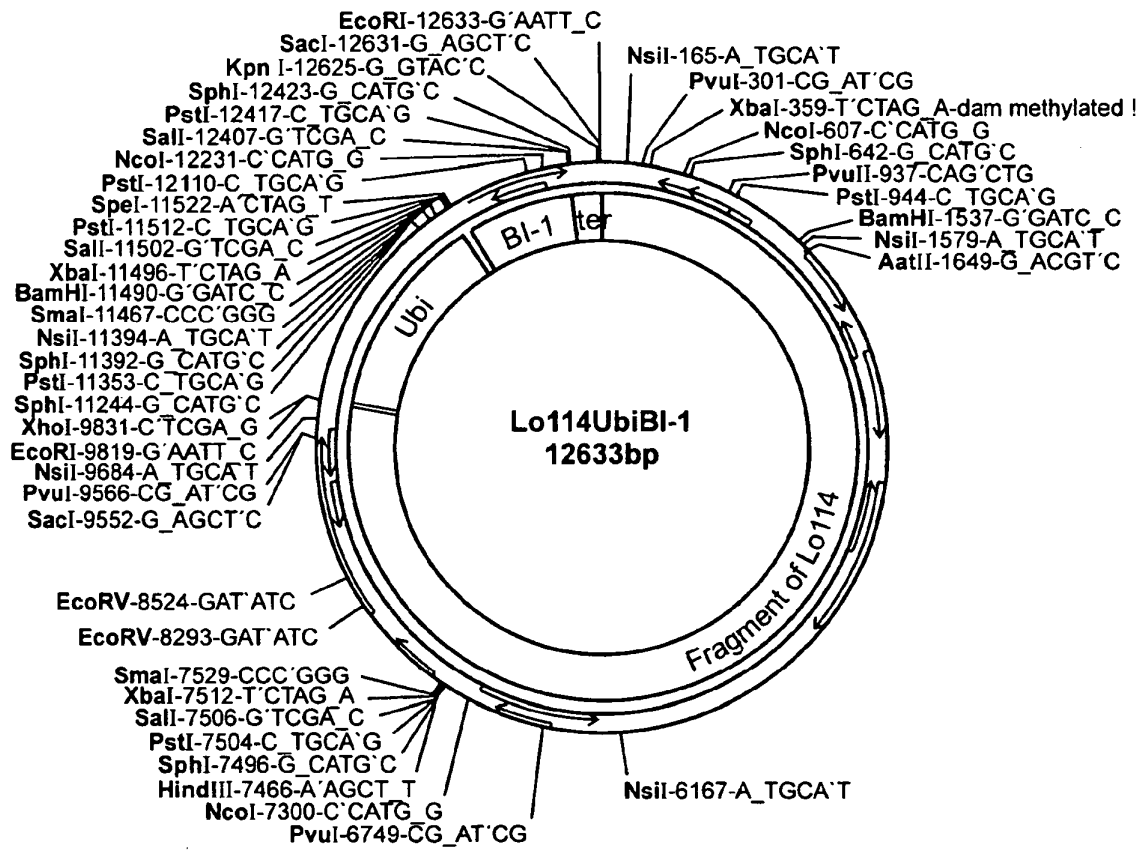
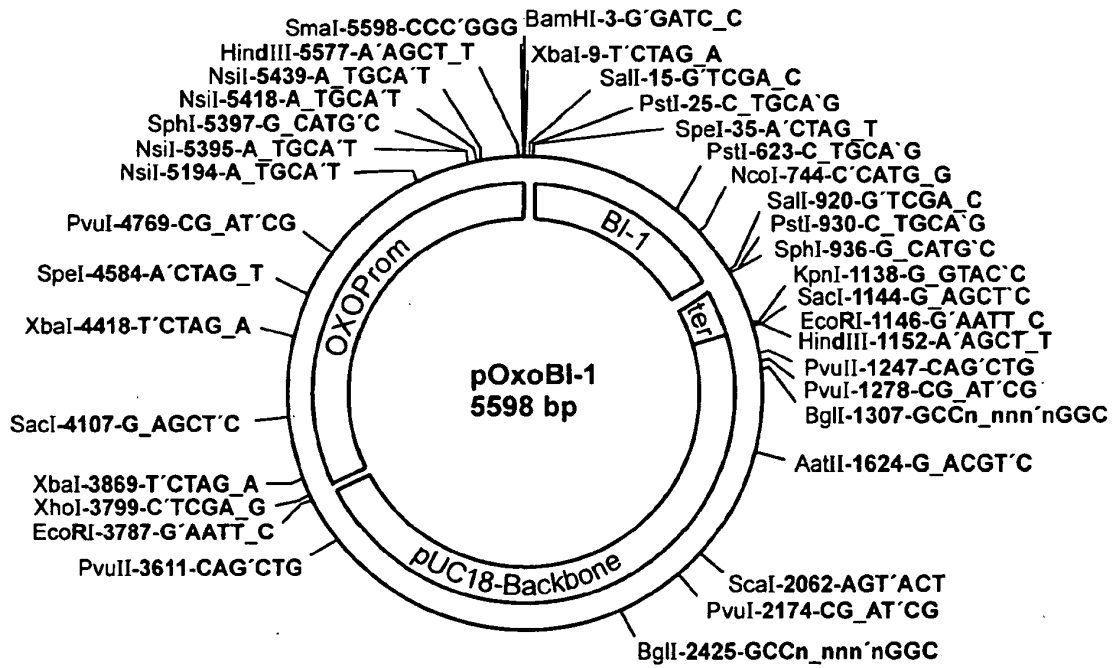


FIG.4



Figur 5

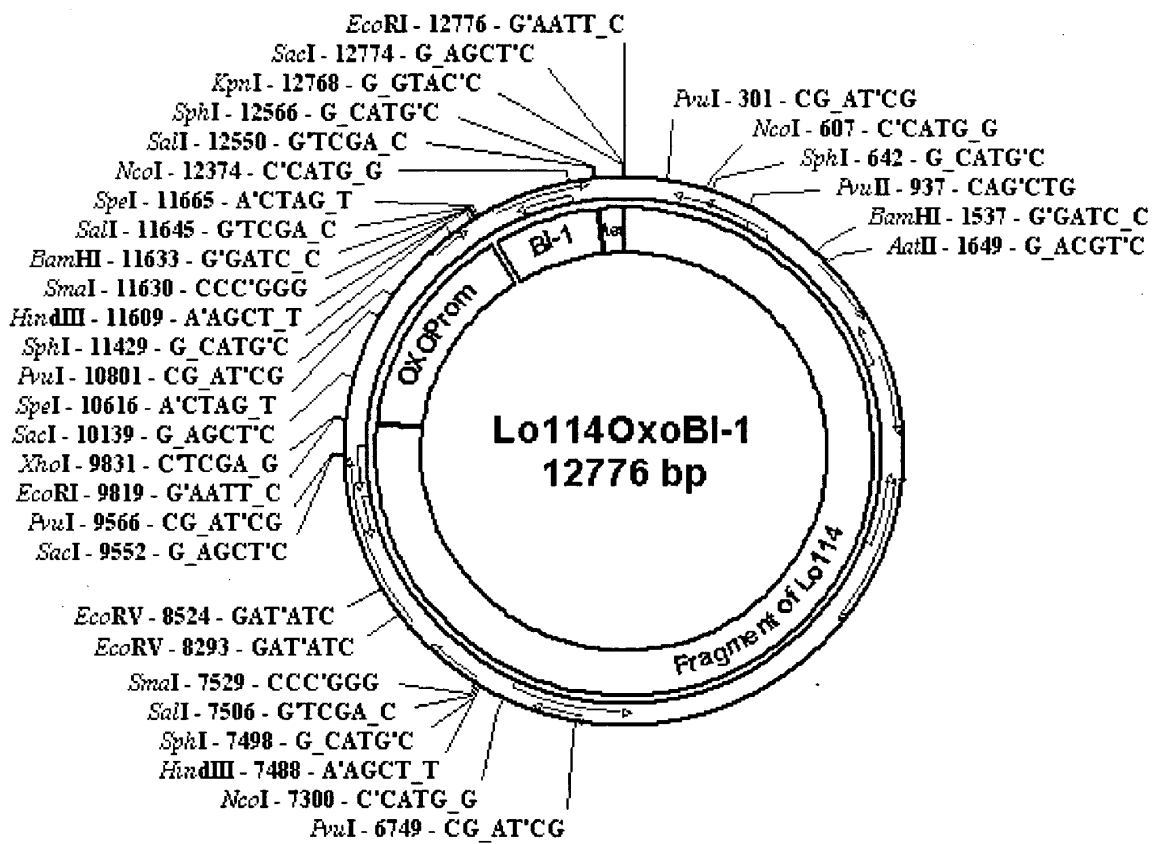


FIG.6

```

H. vul.  IDAFVYSTSS---AAASGVGHFS-KNPRGKSPAVCSHMLLWLTLCFALASSVNGAYLHIA 57
O. sat.  IDAFVYSTSSAYGAAASGVGYFS-KNPRGKSPAVCSHMLLWLTLCVABAASVNGAYLHVA 60
A. tha.  IDAFSSFFDS-OPGSRWSVYSKKNPRGKSPAVENHLKRYLTLCCALVASAFGAYLHVL 59
H. sap.  MNIEDRKIN-----FIAELKESHETESTCHLEKMYASFALCHPVAAGAYVHV 50

H. vul.  LN--IGCHLTMLACVGTIAHFSVSVVYEE--RHFPGLLMGARLDEASVGRLELAVDFD 113
O. sat.  LN--IGCHLTMLGCVGSIAHLSVSVVYEE--RHFPGLLLAALDEASVGRLEKLAVDVD 116
A. tha.  WN--IGCHLTTICIGTHMLLSCEPYEH--QHLSLLEFVSADVDEASVGRLEKVAIDVD 115
H. sap.  THFIQAELLSSALGSLILHMLMATEHSHETECHLGLLAGFEPTEVGLDEALEFCIAVN 110

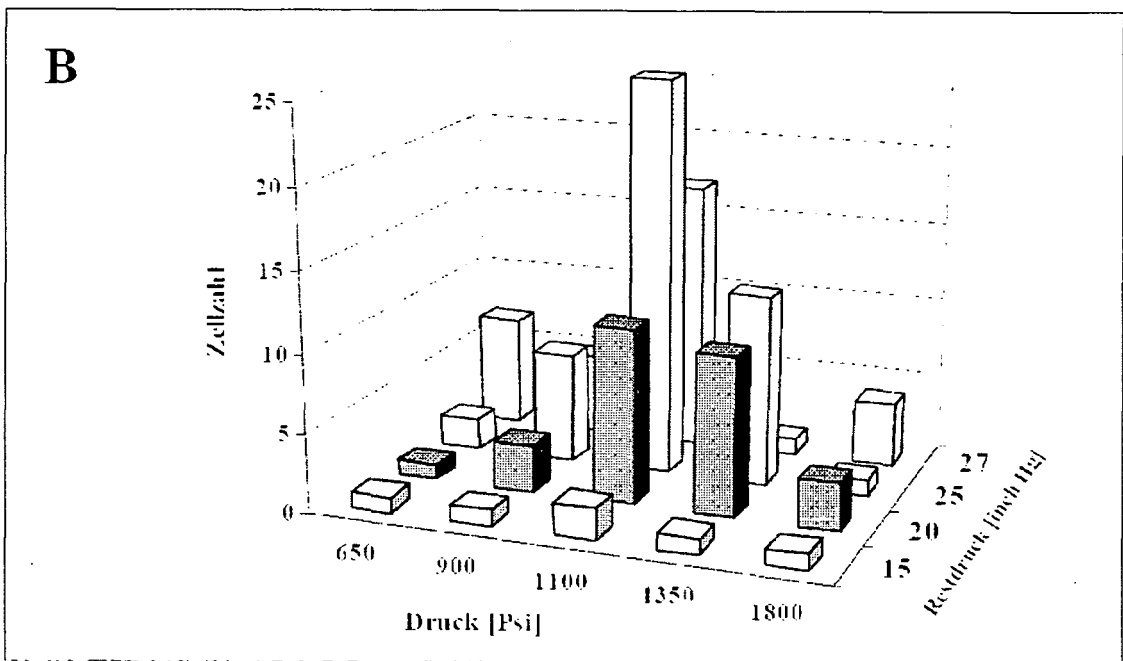
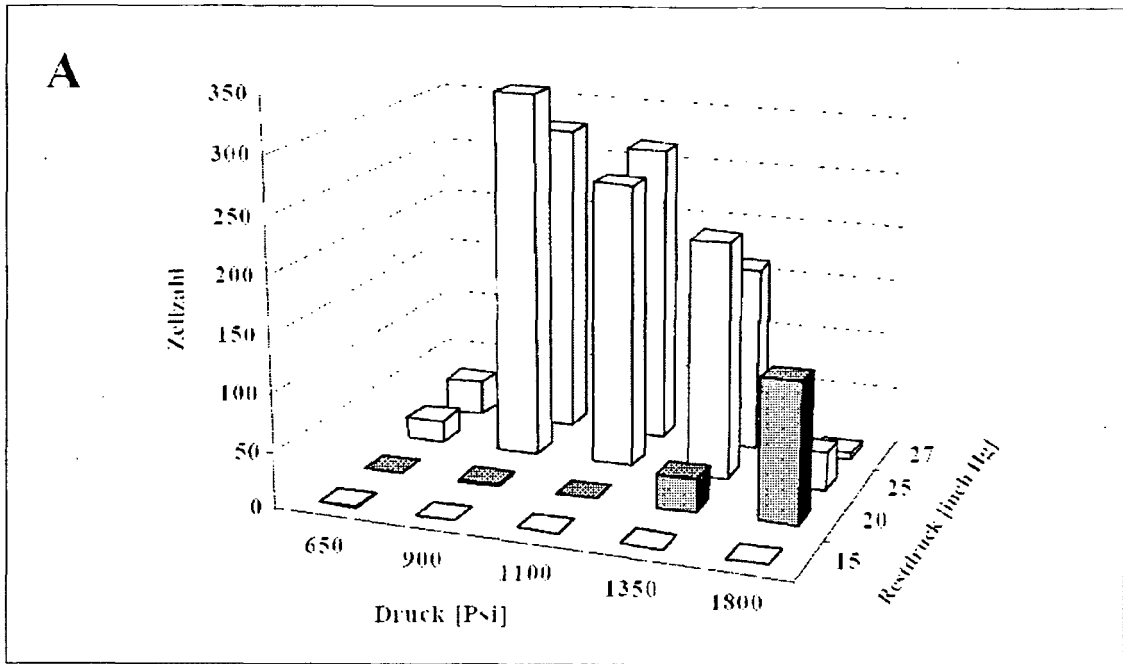
H. vul.  PSLVVTGFVDTSLAFGCFSGAIIIEKFEPLVLCGLLSSGLSISLWLOFVTSIFGHSSGS 173
O. sat.  SGLVVTAFVDTSLAFGCFSTCAIIVKFEPLVLCGLLSSGLSISLWLOFAASIFGHSTGS 176
A. tha.  PSLVVTAFVDTSLAFVFSAAHNLHREFEPLVLCGLLSSGLSISLWLOFAASSIFGHSTAS 175
H. sap.  PSLVVTAFVDTSLAFVFSAAHNLHREFEPLVLCGLLSSGLSISLWLOFAASSIFGHSTAS 169

H. vul.  HFHEVYFGLLIFLCYVYDTIEIERRHGGNDYIKHALLFTDFVAVLVRVLIIMLKMA 233
O. sat.  HFHEVYFGLLIFLCYVYDTIEIERRHGGNDYIKHALLFTDFVAVLVRILVIMLKMA 236
A. tha.  HFHEVYFGLLIFLCYVYDTIEIERRHGGNDYIKHALLFTDFVAVFVRIIIMLKMS 235
H. sap.  HFHEVYFGLLIFLCYVYDTIEIERRHGGNDYIKHALLFTDFVAVFVRIIIMLKMS 229

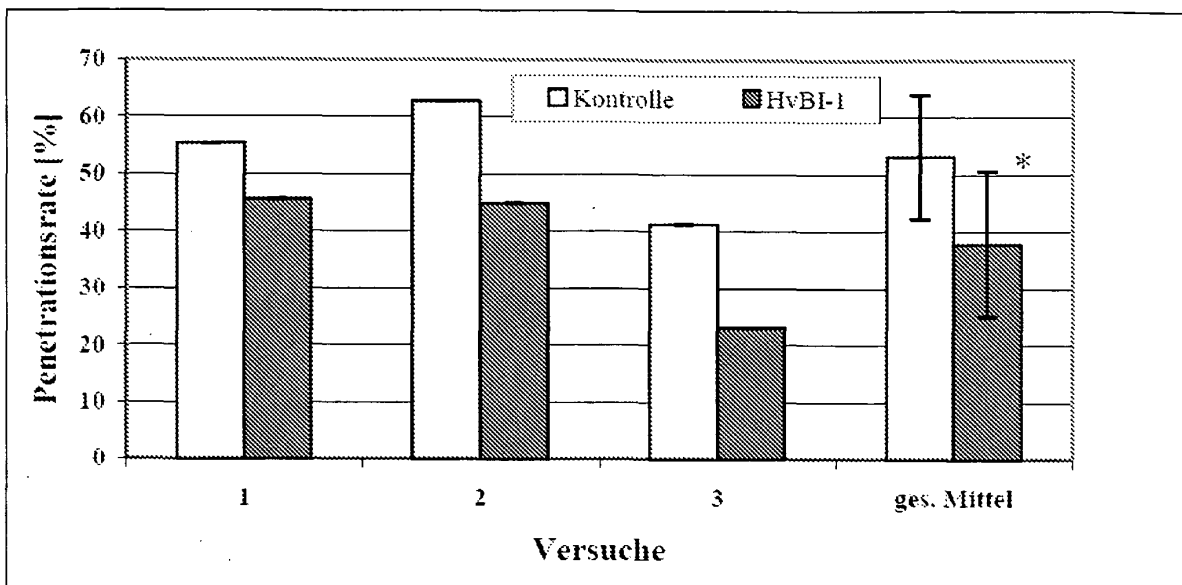
H. vul.  GDFSEDEKPKRRGS 247
O. sat.  SDFSEDEKPKRRS- 249
A. tha.  ADFSEDEKPKRRN- 247
H. sap.  KDFSEDEKPKRR- 237

```

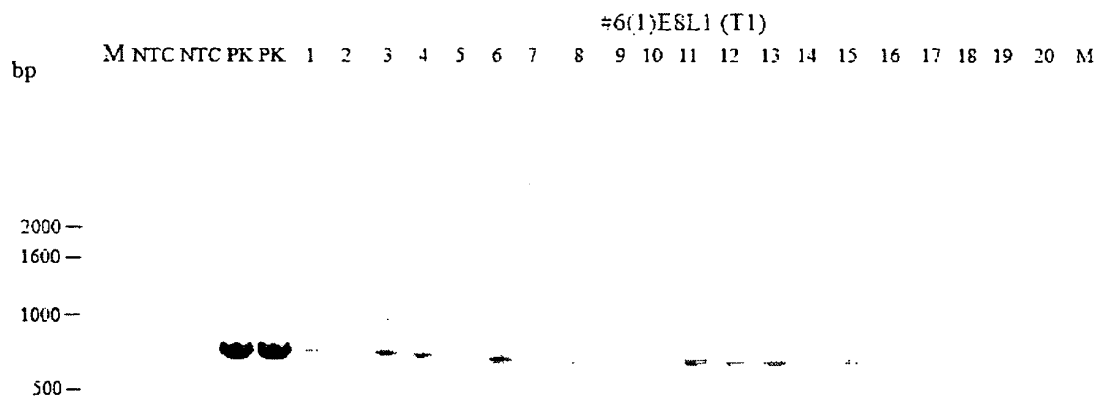

Figur 7



Figur 8



Figur 9



Figur 10

Versuch	Verwendete Konstrukte	transformierte mit Sojarost interagierende Zellen	Transformierte von Sojarost penetrierte Zellen	Penetrationsrate der transformierten Zellen [%]
1	pGY1-GFP-pGY1	46	19	41,30
	pGY1-GFP-pGY1-HvBI	13	3	23,08
2	pGY1-GFP-pGY1	65	36	55,38
	pGY1-GFP-pGY1-HvBI	136	62	45,59
3	pGY1-GFP-pGY1	126	79	62,70
	pGY1-GFP-pGY1-HvBI	203	91	44,83
			Kontrolle	HvBI-1
ges. Mittelwert über die Versuche			53,13	37,83
Standardabweichung			10,88	12,78
t-Test			0,0309	

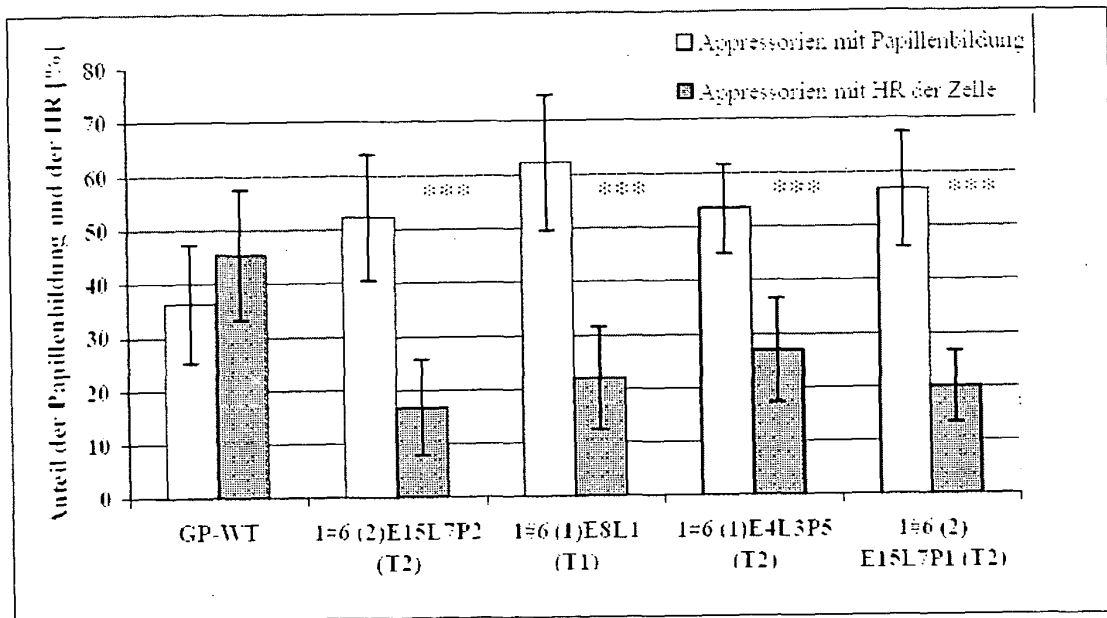
Figur 11a (Seite 1 von 2)

Gerstenlinie	Pfl. Nr.	Sporen	Sporen mit Appressorien	Appressorien mit Papille	HR infizierter Zellen
1#6 (1)E8L1 (T1)	1	139	122	33	55
1#6 (1)E8L1 (T1)	2	167	136	76	23
1#6 (1)E8L1 (T1)	3	167	131	37	21
1#6 (1)E8L1 (T1)	4	194	124	31	26
1#6 (1)E8L1 (T1)	6	169	121	71	34
1#6 (1)E8L1 (T1)	7	158	123	73	28
1#6 (1)E8L1 (T1)	8	143	123	34	33
1#6 (1)E8L1 (T1)	9	156	122	32	16
1#6 (1)E8L1 (T1)	20	147	105	61	24
1#6 (1)E8L1 (T1)	18	175	133	57	25
1#6 (1)E8L1 (T1)	17	134	129	34	16
1#6 (1)E8L1 (T1)	16	176	122	50	51
1#6 (1)E8L1 (T1)	15	168	123	100	23
1#6 (1)E8L1 (T1)	14	168	124	77	11
1#6 (1)E8L1 (T1)	13	143	125	36	20
1#6 (1)E8L1 (T1)	12	153	122	33	25
1#6 (1)E8L1 (T1)	11	141	122	32	31
1#6 (2)E15L7P2 (T2)	1	156	136	72	12
1#6 (2)E15L7P2 (T2)	2	151	125	78	13
1#6 (2)E15L7P2 (T2)	4	173	127	77	21
1#6 (2)E15L7P2 (T2)	14	131	111	40	35
1#6 (2)E15L7P2 (T2)	13	177	122	58	44
1#6 (2)E15L7P2 (T2)	10	175	127	60	22
1#6 (2)E15L7P2 (T2)	9	164	114	60	16
1#6 (2)E15L7P2 (T2)	8	175	126	96	17
1#6 (2)E15L7P2 (T2)	7	152	131	52	18
1#6 (2)E15L7P2 (T2)	6	181	128	53	10
1#6 (2)E15L7P2 (T2)	5	207	129	74	19
GP-WT	1	159	115	54	42
GP-WT	2	150	127	54	53
GP-WT	3	169	123	21	30
GP-WT	4	175	120	63	35
GP-WT	5	162	125	52	56
GP-WT	6	160	121	53	31
GP-WT	7	137	124	45	59
GP-WT	8	160	120	43	33
GP-WT	9	161	126	30	30
GP-WT	10	125	119	46	34
GP-WT	11	165	138	43	53
GP-WT	12	146	126	55	33
GP-WT	13	139	113	34	51
GP-WT	14	147	123	47	50
GP-WT	15	151	130	25	55
GP-WT	16	209	124	33	75
GP-WT	17	210	147	29	46
GP-WT	18	151	132	72	42
GP-WT	19	207	122	50	50
GP-WT	20	199	133	52	52

Figur 11b (Seite 2 von 2)

Gerstenlinie	Pfl. Nr.	Sporen	Sporen mit Appressorien	Appressorien mit Papille	HR infizierter Zellen
1=6 (2) E15L7P1 (T2)	20	129	109	46	26
1=6 (2) E15L7P1 (T2)	19	176	129	81	15
1=6 (2) E15L7P1 (T2)	18	131	129	94	12
1=6 (2) E15L7P1 (T2)	17	209	122	70	21
1=6 (2) E15L7P1 (T2)	16	179	121	76	20
1=6 (2) E15L7P1 (T2)	15	179	128	62	22
1=6 (2) E15L7P1 (T2)	14	156	126	44	43
1=6 (2) E15L7P1 (T2)	13	116	94	34	32
1=6 (2) E15L7P1 (T2)	12	204	139	75	39
1=6 (2) E15L7P1 (T2)	11	194	122	69	39
1=6 (2) E15L7P1 (T2)	10	145	121	60	29
1=6 (2) E15L7P1 (T2)	9	165	121	64	30
1=6 (2) E15L7P1 (T2)	8	192	122	80	23
1=6 (2) E15L7P1 (T2)	7	154	127	74	28
1=6 (2) E15L7P1 (T2)	6	167	121	85	13
1=6 (2) E15L7P1 (T2)	5	169	129	67	20
1=6 (2) E15L7P1 (T2)	4	182	124	86	22
1=6 (2) E15L7P1 (T2)	3	147	117	77	24
1=6 (2) E15L7P1 (T2)	2	151	121	81	25
1=6 (2) E15L7P1 (T2)	1	174	119	59	23
1=6 (1) E4L3P5 (T2)	20	153	121	74	36
1=6 (1) E4L3P5 (T2)	19	159	143	82	39
1=6 (1) E4L3P5 (T2)	18	152	122	82	19
1=6 (1) E4L3P5 (T2)	17	143	131	81	12
1=6 (1) E4L3P5 (T2)	16	179	149	76	39
1=6 (1) E4L3P5 (T2)	15	153	121	46	43
1=6 (1) E4L3P5 (T2)	14	155	124	59	41
1=6 (1) E4L3P5 (T2)	13	145	126	67	33
1=6 (1) E4L3P5 (T2)	12	169	125	67	45
1=6 (1) E4L3P5 (T2)	11	169	123	65	46
1=6 (1) E4L3P5 (T2)	10	157	124	57	46
1=6 (1) E4L3P5 (T2)	9	139	124	68	47
1=6 (1) E4L3P5 (T2)	8	168	120	78	25
1=6 (1) E4L3P5 (T2)	7	153	128	76	15
1=6 (1) E4L3P5 (T2)	6	165	127	78	37
1=6 (1) E4L3P5 (T2)	5	144	136	68	37
1=6 (1) E4L3P5 (T2)	4	134	132	53	55
1=6 (1) E4L3P5 (T2)	3	138	156	75	34
1=6 (1) E4L3P5 (T2)	2	153	139	77	14
1=6 (1) E4L3P5 (T2)	1	162	123	51	39

Figur 12



IN DER BESCHREIBUNG AUFGEFÜHRTE DOKUMENTE

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde ausschließlich zur Information des Lesers aufgenommen und ist nicht Bestandteil des europäischen Patentdokumentes. Sie wurde mit größter Sorgfalt zusammengestellt; das EPA übernimmt jedoch keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

In der Beschreibung aufgeführte Patentdokumente

- WO 9804586 A [0024] [0056] [0057]
- WO 0001722 A [0024] [0056] [0057]
- WO 9947552 A [0024] [0056] [0057]
- WO 0026391 A [0026]
- WO 2005306368 A, Dudler [0048]
- US 200220115849 A [0050]
- WO 200320939 A [0058] [0059] [0065]
- WO 200409820 A [0060]
- EP 0307589 W [0060]
- WO 03074688 A [0061] [0062]
- WO 9845456 A [0143] [0144]
- WO 9741228 A [0143]
- EP 120516 A [0153]
- US 5565350 A [0157]
- WO 0015815 A [0157]
- WO 2004081217 A [0173] [0174]
- EP 06122870 A [0194]

In der Beschreibung aufgeführte Nicht-Patentliteratur

- **ENTRUP N.L. et al.** Lehrbuch des Pflanzenbaues. Thomas Mann Verlag, 2000 [0002] [0004]
- **BÖRNER H.** Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. Ulmer Verlag Stuttgart, 1997 [0004]
- **SITTE P. et al.** Strasburger - Lehrbuch der Botanik. Gustav Fischer Verlag, 1998 [0004]
- **HOWARD R.J. et al.** *Annu. Rev. Microbiol.*, 1996, vol. 50, 491 [0005]
- **KUO K. et al.** *Fungal Genet. Biol.*, 1996, vol. 20, 18 [0005]
- The powdery mildews, a comprehensive treatise. **GREEN J.R. et al.** The formation and function of infection and feeding structures. APS Press, 2002 [0005]
- **KOCH E. et al.** *Phytopath. Z.*, 1983, vol. 106, 302 [0005] [0013] [0033]
- **TUCKER S.L. et al.** *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2001, vol. 39, 385 [0005]
- **PRELL H.H.** Interaktionen von Pflanzen und phytopathogenen Pilzen. Gustav Fischer Verlag, 1996 [0006] [0007] [0011] [0020]
- **KEEN N.T. et al.** Elicitor-Rezeptor-Modell. *Phytopathology*, 1972, vol. 62, 768 [0008]
- **GARCIA BRUGGER et al.** *MPMI*, 2006, vol. 19, 711 [0008]
- Gen-für-Gen-Hypothese. *Flor. J. Agric. Res.*, 1947, vol. 74, 241 [0008]
- **HÜCKELHOVEN R. et al.** *Plant Physiol.*, 1999, vol. 119, 1251 [0010] [0033]
- **ASSAAD F.F. et al.** *Mol. Biol. of the Cell*, 2004, vol. 15, 5118 [0010]
- **WARD J.M. et al.** *Plant Cell*, 1995, vol. 7, 833 [0010]
- **WENDEHENNE D. et al.** *Plant Cell*, 2002, vol. 14, 1937 [0010]
- **HEATH M.** *Plant Mol. Biol.*, 2000, vol. 44, 321 [0010]
- **GRANT J.J. et al.** *Plant Physiol.*, 2000, vol. 124, 21 [0011]
- **GARCIA-BRUGGER A. et al.** *MPMI*, 2006, vol. 19, 711 [0011]
- **VAN LOON L.C. et al.** *Physiol. Mol. Plant Physiol.*, 1999, vol. 55, 85 [0011]
- **THORDAL-CHRISTENSEN H.** *Current Opinion in Plant Biology*, 2003, vol. 6, 351 [0011]
- **FREDERICK R.D. et al.** *Phytopathology*, 2002, vol. 92, 217 [0012]
- **ONO Y. et al.** *Mycol. Res.*, 1992, vol. 96, 825 [0012]
- Proceedings of the soybean rust workshop. National Soybean Research Laboratory, Publication No. 1, 1995 [0012] [0033]
- **RYTTER J.L. et al.** *Plant Dis.*, 1984, vol. 87, 818 [0012]
- **YEH C.C. et al.** *Phytopathology*, 1981, vol. 71, 1111 [0013]
- **HYMOWITZ T.** *Econ. Bot.*, 1970, vol. 24, 408 [0014]
- **HARTWIG E.E. et al.** *Crop Science*, 1983, vol. 23, 237 [0017]
- **HARTWIG E.E.** *Crop Science*, 1986, vol. 26, 1135 [0017]
- **POSADA-BUITRAGO M.L. et al.** *Fungal Genetics and Biology*, 2005, vol. 42, 949 [0017]
- **HARTMAN G..I. et al.** *Plant Disease*, 1992, vol. 76, 396 [0017]
- **SINGH R. et al.** *Wendl. Theor. Appl. Genet.*, 1987, vol. 74, 391 [0017]
- **FENG C.C.P. et al.** *PNAS*, 2005, vol. 102, 17290 [0018]
- **LAM E. et al.** *Nature*, 2001, vol. 411, 848 [0020]
- **GREEN D.R. et al.** *Science*, 1998, vol. 281, 1309 [0020]
- **N. TABACUM ; LACOMME C. et al.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, 7956 [0020]

- **KAWAI-YAMADA M. et al.** *Plant Cell*, 2004, vol. 16, 21 [0020]
- **HÜCKELHOVEN R.** *Apoptosis*, 2004, vol. 9, 299 [0020]
- **EICHMANN R. et al.** *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2004, vol. 17, 484 [0020] [0021] [0033]
- **BOLDUC N. et al.** *Planta*, 2003, vol. 216, 377 [0020] [0115] [0124] [0128]
- **KAWAI-YAMADA et al.** *Plant Cell*, 2004, vol. 16, 21 [0020]
- **XU Q. et al.** *Mol. Cell*, 1998, vol. 18, 1084 [0020]
- **BALDUC N. et al.** *FEBS Lett.*, 2003, vol. 532, 111 [0020]
- **HÜCKELHOVEN R. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, vol. 29, 5555 [0020]
- **MATSUMURA H. et al.** *Plant J.*, 2003, vol. 33, 425 [0020] [0021] [0026] [0128]
- **BAEK D. et al.** *Plant Mol. Biol.*, 2004, vol. 56, 15 [0020]
- **WATANABE N. et al.** *Plant J.*, 2006, vol. 45, 884 [0020] [0021]
- **HÜCKELHOVEN R. et al.** *Plant Mol. Biol.*, 2001, vol. 47, 739 [0021]
- **IMANI J. et al.** *Mol. Plant Physiol.* [0021]
- **LINCOLN J.E. et al.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2002, vol. 99, 15217 [0021]
- **WARD J.M. et al.** *Plant Cell*, 1991, vol. 3, 1085 [0022]
- **UKNES et al.** *Plant Cell*, 1992, vol. 4 (6), 645 [0022]
- **FRIEDRICH et al.** *Plant J.*, 1996, vol. 10 (1), 61 [0022]
- **LAWTON et al.** *Plant J.*, 1996, vol. 10, 71 [0022]
- **BÜSCHGES R. et al.** *Cell*, 1997, vol. 88, 695 [0023] [0024] [0056]
- **JORGENSEN J.H.** *Euphytica*, 1977, vol. 26, 55 [0023] [0056]
- **LYNGKJAER M.F. et al.** *Plant Pathol.*, 1995, vol. 44, 786 [0023]
- **SCHULZE-LEFERT P. et al.** *Trends Plant Sci.*, 2000, vol. 5, 343 [0024]
- **WOLTER M. et al.** *Mol. Gen. Genet.*, 1993, vol. 239, 122 [0024]
- **JÖRGENSEN J.H.** *Euphytica*, 1992, vol. 63, 141 [0024]
- **JAROSCH B. et al.** *Mol. Plant Microbe Interact.*, 1999, vol. 12, 508 [0024]
- **KUMAR J. et al.** *Phytopathology*, 2001, vol. 91, 127 [0024]
- **XU Q. et al.** *Mol. Cell*, 1998, vol. 1 (3), 337 [0025]
- **ROTH W. et al.** *Nat. Med.*, 2002, vol. 8, 216 [0025]
- **KAWAI et al.** *FEBS Lett.*, 1999, vol. 464, 143 [0025]
- **SANCHEZ et al.** *Plant J.*, 2000, vol. 21, 393 [0025]
- **KAWAI-YAMADA M. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, vol. 98 (21), 12295 [0025]
- **BOLDUC N. et al.** *Planta*, 2003, vol. 216, 377-386 [0025]
- **HÜCKELHOVEN R. et al.** *Plant Mol. Biol.*, 2001, vol. 47 (6), 739 [0025]
- **HÜCKELHOVEN R.** *FEMS Microbiol. Letters*, 2005, vol. 245, 9 [0033]
- **HOPPE H.H. ; BANGKOK et al.** *Pro. Intern. Congress of SABRAO*, 1985 [0033]
- **HÜCKELHOVEN R. et al.** *Mol. Plant Pathol.*, 2001, vol. 2, 199 [0033]
- **HÜCKELHOVEN R. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, vol. 29, 5555 [0033]
- **KAMOUN S. et al.** *Plant Cell*, 1998, vol. 10, 1413 [0033]
- **WEI Y. ; ZHANG Z. ; ANDERSEN C.H. ; SCHMELZER E. ; GREGERSEN P.L. ; COLLINGE D.B. ; SMEDEGAARD-PETERSEN V. ; THORDAL-CHRISTENSEN H.** *Plant Molecular Biology*, 1998, vol. 36, 101 [0048] [0050]
- **SCHWEIZER P. ; CHRISTOFFEL A. ; DUDLER R.** *Plant J.*, 1999, vol. 20, 541 [0048] [0050]
- **KRISTENSEN B.K. ; AMMITZBÖLL H. ; RASMUSSEN S.K. ; NIELSEN K.A.** *Molecular Plant Pathology*, 2001, vol. 2 (6), 311 [0048]
- **WU S. ; DRUKA A. ; HORVATH H. ; KLEINHOF A. ; KANNANGARA G. ; VON WETTSTEIN D.** *Plant Phys Biochem*, 2000, vol. 38, 685 [0048]
- **KLÖTI A. ; HENRICH C. ; BIERI S. ; HE X. ; CHEN G. ; BURKHARDT P.K. ; WÜNN J. ; LUCCA P. ; HOHN T. ; POTRYKUS I.** *PMB*, 1999, vol. 40, 249 [0048]
- **ANCILLO et al.** *Planta*, 2003, vol. 217 (4), 566 [0048]
- **GRALLATH et al.** *Plant Physiology*, 2005, vol. 137 (1), 117 [0048]
- **AARÓN et al.** *Plant Cell*, 2004, vol. 16 (9), 2463 [0048]
- **ALTPETER et al.** *Plant Molecular Biology.*, 2005, vol. 57 (2), 271 [0048]
- **KAUSCH A.P. ; OWEN T.P. ; ZACHWIEJA S.J. ; FLYNN A.R. ; SHEEN J.** *Plant Mol. Biol.*, 2001, vol. 45, 1 [0050]
- **OSRBCS, KYOZUKA et al.** *PlaNt Phys*, 1993, vol. 102, 991 [0050]
- **KYOZUKA J. ; MCELROY D. ; HAYAKAWA T. ; XIE Y. ; WU R. ; SHIMAMOTO K.** *Plant Phys.*, 1993, vol. 102, 991 [0050]
- **BRYNGELSSON et al.** *Mol. Plant Microbe Interact.*, 1994, vol. 7 (2), 267 [0050]
- **BRYNGELSSON et al.** *Mol. Plant Microbe Interact.*, 1994, vol. 7 (2), 267 [0050]
- **KRISTENSEN et al.** *Molecular Plant Pathology*, 2001, vol. 2 (6), 311 [0050]
- **LYNGKJAER M.F. et al.** *Plant Pathol.*, 1995, vol. 44, 786 [0056]
- **MANIATIS T. ; FRITSCH E.F. ; SAMBROOK J.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 [0073]
- **SILHAVY T.J. ; BERMAN M.L. ; ENQUIST L.W.** *Experiments with Gene Fusions.* Cold Spring Harbor Laboratory, 1984 [0073]

- **AUSUBEL F.M. et al.** Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, 1987 [0073]
- **GELVIN et al.** Plant Molecular Biology Manual. 1990 [0073]
- **ALTSCHUL et al.** *Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 25, 3389 [0118]
- Molecular Cloning. **SAMBROOK J. ; FRITSCH E.F. ; MANIATIS T. et al.** A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 9.31-9.57 [0123]
- Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, 1989, 6.3.1-6.3.6 [0123]
- **GOA J.** *Scand J. Clin. Lab. Invest.*, 1953, vol. 5, 218 [0128]
- **LOWRY O.H. et al.** *J Biol Chem*, 1951, vol. 193, 265 [0128]
- **BRADFORD M.M.** *Analyt. Biochem.*, 1976, vol. 72, 248 [0128]
- **BOLDUC N. et al.** *FEBS Lett*, 2002, vol. 532, 111 [0128]
- The Maize Handbook. Springer, 1994 [0139]
- **GALLIE et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1987, vol. 15, 8693 [0139]
- **ROUSTER J. et al.** *Plant J*, 1998, vol. 15, 435 [0139]
- **SAUER B.** *Methods*, 1998, vol. 14 (4), 381 [0142]
- **SCHENBORN E. ; GROSKREUTZ D.** *Mol, Biotechnol.*, 1999, vol. 13 (1), 29 [0143]
- **SHEEN et al.** *Plant Journal*, 1995, vol. 8 (5), 777 [0143]
- **HASELOFF et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94 (6), 2122 [0143]
- **REICHEL et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93 (12), 5888 [0143]
- **TIAN et al.** *Plant Cell Rep.*, 1997, vol. 16, 267 [0143]
- **CHUI W.L. et al.** *Curr. Biol.*, 1996, vol. 6, 325 [0143]
- **LEFFEL S.M. et al.** *Biotechniques*, 1997, vol. 23 (5), 912 [0143]
- **OW et al.** *Science*, 1986, vol. 234, 856 [0143]
- **MILLAR et al.** *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1992, vol. 10, 324 [0143]
- **PRASHER et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1985, vol. 126 (3), 1259 [0143]
- Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts. **DELLAPORTA et al.** 18th Stadler Genetics Symposium. 1988, vol. 11 [0143]
- **JEFFERSON et al.** *EMBO J.*, 1987, vol. 6, 3901 [0143]
- **SAMBROOK et al.** Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0143]
- **MCCORMICK et al.** *Plant Cell Reports*, 1986, vol. 5, 81 [0144]
- **KEOWN et al.** *Methods Enzymol.*, 1990, vol. 185, 527 [0148]
- Techniques for Gene Transfer. **JENES B. et al.** Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization. Academic Press, 1993, vol. 1, 128-143 [0148]
- **POTRYKUS.** *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.*, 1991, vol. 42, 205 [0148]
- **BILANG et al.** *Gene*, 1991, vol. 100, 247 [0149]
- **SCHEID et al.** *Mol. Gen. Genet.*, 1991, vol. 228, 104 [0149]
- **GUERCHE et al.** *Plant Science*, 1987, vol. 52, 111 [0149]
- **NEUHAUSE et al.** *Theor. Appl. Genet.*, 1987, vol. 75, 30 [0149]
- **KLEIN et al.** *Nature*, 1987, vol. 327, 70 [0149]
- **HOWELL et al.** *Science*, 1980, vol. 208, 1265 [0149]
- **HORSCH et al.** *Science*, 1985, vol. 227, 1229 [0149]
- **DEBLOCK et al.** *Plant Physiol*, 1989, vol. 91, 694 [0149]
- **HORSCH R.B. et al.** *Science*, 1985, vol. 225, 1229 [0151]
- **HOLSTERS et al.** *Mol. Gen. Genet.*, 1978, vol. 163, 181 [0153]
- **HOEKEMAIN.** The Binary Plant Vector System, Off-setdrukkerij Kanters B.V., Alblisserdam. 1985 [0153]
- **AN et al.** *EMBO J.*, 1985, vol. 4, 277 [0153]
- **BEVAN et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1984, vol. 12, 8711 [0153]
- **ROGERS et al.** *Methods Enzymol.*, 1987, vol. 153, 253 [0153]
- **SCHARDL et al.** *Gene*, 1987, vol. 61, 1 [0153]
- **BERGER et al.** *Proc. Natl. A-cad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 8402 [0153]
- **FENNELL et al.** *Plant Cell Rep.*, 1992, vol. 11, 567 [0155]
- **STOEGER et al.** *Plant Cell Rep.*, 1995, vol. 14, 273 [0155]
- **JAHNE et al.** *Theor. Appl. Genet.*, 1984, vol. 89, 525 [0155]
- **DUNWELL J.M.** *J. Exp. Bot.*, 2000, vol. 51, 487 [0156]
- Voet, Voet. Wiley Press, 896-897 [0164]
- **SAMBROOK et al.** *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989 [0164]
- **SANGER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, vol. 74, 5463 [0164]
- **SCHWEIZER P. et al.** *MPMI*, 1999, vol. 12, 647 [0179]
- **CHENG Z. et al.** *Plant Mol. Biol.*, 2004, vol. 60, 583 [0181]
- **TAYLOR et al.** *DNA & Cell Biology.*, 2002, vol. 21 (12), 963 [0181]
- **RAKOCZY-TROJANOWSKA.** *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2002, vol. 7 (3), 849 [0181]
- **GRABOWSKA A.** *Acta Physiologiae Plantarum.*, 2004, vol. 26 (4), 451 [0181]
- **CHESNOKOV V.** *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya.*, 2004, vol. 1, 26 [0181]
- **TRAVELLA S. et al.** *Plant Cell Reports*, 2005, vol. 23 (12), 780 [0181]
- **MURRAY F. et al.** *Plant Cell Reports*, 2004, vol. 22 (6), 397 [0181]